



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 324 758**

② Número de solicitud: 200703123

⑤ Int. Cl.:
C07K 1/20 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.11.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.08.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá**
Pza. de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **García López, María Concepción;**
García de Freitas, Beatriz;
García Ruiz, Carmen;
Cifuentes Gallego, Alejandro y
Marina Alegre, María Luisa

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimientos para la diferenciación rápida entre soja transgénica y no transgénica empleando perfiles proteicos cromatográficos.**

㉑ Resumen:

Procedimientos para la diferenciación rápida entre soja transgénica y no transgénica empleando perfiles proteicos cromatográficos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en fase inversa empleando columnas monolíticas y de perfusión. Ambos métodos se basan en un gradiente binario y lineal en dos etapas con acetonitrilo-agua-ácido trifuroacético a un flujo de 3 ml/min y empleando detección UV a 280 nm. Su aplicación conjunta con técnicas de clasificación multivariante, conduce a un mayor aseguramiento de los resultados, en especial cuando el contenido en material transgénico es pequeño.

ES 2 324 758 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la diferenciación rápida entre soja transgénica y no transgénica empleando perfiles proteicos cromatográficos.

Los procedimientos analíticos propuestos permiten la diferenciación entre soja transgénica y no transgénica mediante el análisis de los perfiles proteicos obtenidos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) con fases estacionarias monolíticas y perfusivas. Teniendo en cuenta la enorme controversia asociada al consumo de alimentos transgénicos y al hecho de que empieza a haber estudios científicos que demuestran que algunas modificaciones genéticas podrían tener consecuencias nutricionales e incluso toxicológicas, estos procedimientos suponen un gran avance por dos motivos: (i) ofrecen la posibilidad de emplear técnicas cromatográficas de análisis que pueden implementarse fácilmente en análisis de rutina y (ii) permiten el cribado rápido entre soja transgénica y no transgénica basándose en el análisis de perfiles proteicos expresados a partir del ADN original o modificado (transgénico).

Estado de la técnica

El alto consumo y aplicación de la soja se debe a su bajo coste y a sus apreciadas propiedades funcionales y nutritivas, lo que ha resultado en un creciente interés por mejorar su cultivo y características [1,2]. La mejora en la producción de soja también está relacionada con la resistencia a insectos y enfermedades de las plantas. En este sentido, mientras la resistencia genética a la mayoría de las enfermedades que afectan a la soja (hongos, bacterias, virus, nemátodos) ya están disponibles en las colecciones fitogenéticas, la resistencia a los insectos ha sido un objetivo difícil de alcanzar por técnicas convencionales de cultivo. El progreso en la tecnología de ADN recombinante ha permitido la producción de organismos modificados genéticamente (OMG) mediante la introducción en el genoma de la planta de un nuevo gen que expresa una nueva proteína. Con respecto a la soja, un logro importante ha sido el desarrollo de tolerancia al herbicida glifosato [3]. El glifosato es un herbicida que elimina plantas inhibiendo el enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que está involucrado en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Algunos microorganismos, como el *Agrobacterium tumefaciens strain CP4*, tienen una versión de este enzima que es resistente a la inhibición del glifosato. El gen que codifica el enzima CP4-EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* se ha transferido a la soja empleando la tecnología genética molecular resultando una soja con tolerancia al glifosato llamada Roundup Ready™ que se comercializó por primera vez por la empresa Monsanto en 1996 [4]. Así, el uso de soja Roundup Ready™ permite a los agricultores emplear el herbicida glifosato para eliminar las malas hierbas sin dañar la soja. Hoy en día, la mayoría de los campos de soja en los Estados Unidos están plantados con soja resistente al glifosato, siendo EEUU el mayor productor de soja transgénica seguido de Argentina y Brasil [5].

Sin embargo, el cultivo y comercialización de cultivos transgénicos ha provocado una enorme controversia pública. Los productores defienden que los cultivos transgénicos son, desde un punto de vista económico (mejora la producción) y medioambiental (bajo empleo de agroquímicos), más beneficiosos que los cultivos no transgénicos siendo equivalentes en composición a éstos. Por otro lado, los detractores de los cultivos transgénicos afirman que el consumo de transgénicos conlleva muchos riesgos como la aparición de alérgenos producidos por la expresión de proteínas nuevas, la transferencia de resistentes a antibióticos procedentes de los genes marcadores, etc. [6,7]. Además, aunque los productos transgénicos son casi idénticos a los no transgénicos, hay estudios que demuestran que algunas variaciones podrían tener consecuencias nutricionales y toxicológicas [8,9]. Esta controversia ha provocado que algunos países hayan establecido niveles máximos para los productos etiquetados que contienen soja transgénica como Japón (tolerancia del 5%), Corea (3%), Noruega (2%), Suiza (1%) y la Unión Europea (0.9% incluyendo España) mientras que en otros como EEUU no hay limitaciones de modo que los alimentos que contengan OMGs no necesitan un etiquetado especial [11].

Todas estas restricciones demandan el desarrollo de métodos analíticos rápidos y fiables que permitan la detección de OMGs a los niveles establecidos por las normativas de cada país. La mayoría de las metodologías detectan OMGs mediante el examen de secuencias específicas de ADN amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta metodología consiste en diferentes etapas: muestreo, extracción del ADN, purificación, amplificación y detección de las secuencias amplificadas [12]. El proceso es largo, complejo y está sujeto con mucha frecuencia a contaminaciones por ADN lo que da como resultado falsos positivos. Las proteínas son otra diana que podría ser útil para la detección de soja transgénica. La nueva proteína expresada por la inserción de genes ha sido detectada por ensayos de inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA) y analizada por espectrometría de masas [13,14].

El propósito de esta invención es poner a punto procedimientos simples y rápidos basados en el análisis de perfiles proteicos que podrían implementarse fácilmente para análisis de rutina y rastreo de soja transgénica y no transgénica. Los perfiles proteicos se obtendrían empleando una técnica habitualmente existente en los laboratorios como es HPLC con fases estacionarias monolíticas y perfusivas. No hay ninguna metodología similar que se haya empleado para la detección de soja transgénica a pesar de que un procedimiento similar ya se había explorado con éxito para la identificación de cultivos de soja [15]. Sin embargo, se ha llevado a cabo recientemente por nuestro grupo de investigación la caracterización de cultivos transgénicos y no transgénicos de soja [16] y maíz [17] basada en el estudio de perfiles proteicos obtenidos por electroforesis capilar (CE) y HPLC, respectivamente. Estos estudios previos establecen las bases para hacer frente al reto de desarrollar procedimientos alternativos al análisis clásico de ADN basados en el análisis de proteínas.

Descripción de la invención

La invención consiste en dos procedimientos analíticos por HPLC en fase inversa empleando columnas monolíticas y de perfusión para la diferenciación rápida entre soja transgénica y no transgénica empleando perfiles proteicos cromatográficos obtenidos mediante los procedimientos descritos en la tabla 1.

TABLA 1

Resumen de los procedimientos cromatográficos para la separación de las proteínas de soja empleando una columna monolítica y de perfusión. TFA: ácido trifluoroacético; ACN: acetonitrilo

PROCEDIMIENTO	MONOLÍTICO	PERFUSIVO
Columna	Cromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm (Merck)	POROS R2/H, 50 x 4.6 mm (Perseptive Biosystems)
Fase móvil A:	Agua + 0.1 % (v/v) TFA	Agua + 0.1 % (v/v)TFA
Fase móvil B:	ACN + 0.1 % (v/v) TFA	ACN + 0.1 % (v/v) TFA
Flujo	3 mL/min	3 mL/min
Gradiente	5-30 % (v/v) B en 6.0 min 30-85 % (v/v) B en 2.0 min	5-25 % (v/v) B en 1.7 min 25-45 % (v/v) B en 0.8 min
Temperatura	30 °C	60 °C
Inyección de muestra	20 µL	20 µL
Detección UV	280 nm	280 nm
Tiempo de elución	< 8 min	< 3 min
Número de picos	15	14
Picos característicos para la diferenciación entre soja transgénica y no transgénica	8 y 9	3 y 4

Estas condiciones de separación se aplicaron a muestras disueltas en mezclas de agua:ACN (80:20 v/v) que permitían observar el mismo perfil proteico durante, al menos, una semana. Si el contenido acuoso era mayor las disoluciones eran más inestables y si el contenido orgánico aumentaba cambiaba el perfil proteico observado.

Las ventajas principales de los procedimientos cromatográficos para la diferenciación entre soja transgénica y no transgénica son las siguientes:

- Los procedimientos objeto de la invención son sencillos, rápidos y asequibles porque emplean una instrumentación básica en la mayoría de los laboratorios de análisis, en concreto un cromatógrafo de líquidos.
- Ambos procedimientos permiten la separación rápida de las proteínas de soja. En el caso de la columna monolítica se obtienen 15 picos en menos de 8 min y con la columna de perfusión se observan 14 picos en unos 3 minutos.
- El procedimiento de tratamiento de la muestra es simple y rápido en ambos procedimientos porque supone la molienda de las habas de soja y su posterior disolución en un medio compuesto por agua:ACN (80:20 v/v), sonicación y centrifugación previamente al análisis cromatográfico.
- Los dos procedimientos cromatográficos pueden emplearse para hacer un cribado rápido (“screening”) que permita diferenciar entre soja transgénica y no transgénica cuando el contenido en soja transgénica sea elevado. Así, los picos 8 y 9 para la columna monolítica y los picos 3 y 4 para la columna de perfusión, cambian su relación de tamaño en función de que se trate de soja transgénica o no transgénica.

ES 2 324 758 A1

- Los procedimientos cromatográficos junto con el empleo de técnicas de clasificación multivariante permiten diferenciar entre soja transgénica y no transgénica incluso cuando el contenido en material transgénico es pequeño. Se han empleado métodos multivariantes como el análisis cluster (método de Ward) y el análisis discriminante, permitiendo ambos la clasificación adecuada de las 16 muestras analizadas (6 no transgénicas, 5 transgénicas comprobadas por análisis de ADN y 5 patrones que contenían 0, 0.5, 1, 2 y 5% (m/m) de soja transgénica).

Descripción de las figuras

Figura 1. Cromatogramas correspondientes a la separación de las proteínas de soja en cinco muestras de soja: dos transgénicas (SB8 y SB9), dos no transgénicas (SB1 y SB2) y otra con cierto carácter transgénico confirmado por análisis de ADN (SB3), empleando el procedimiento (A) monolítico y (B) perfusivo. Condiciones cromatográficas indicadas en la tabla 1.

Figura 2. Dendogramas obtenidos por análisis Cluster de los datos de porcentaje en área obtenidos para las 16 muestras analizadas por los métodos monolíticos y de perfusión.

Modo de realización

La aplicación de los procedimientos a un grupo de 16 muestras: 6 habas de soja no transgénicas (SB1, SB2, SB4, SB5, SB6 y SB7), 5 habas de soja transgénicas (SB3, SB8, SB9, SB10 y SB11) y 5 patrones comerciales con distintos porcentajes de soja transgénica (0, 0.5, 1, 2, y 5% (m/m)) se citan como ejemplos.

Preparación de muestras y patrones

Las habas de soja se muelen en un molinillo de café durante unos 5 min mientras que los patrones comerciales (de Sigma) vienen molidos. Se preparan suspensiones con unos 5 mg de haba de soja molida o patrón /mL del medio de disolución: agua:ACN (80:20, v/v) que se sonicán a 25°C durante 10 min y se centrifugan a 3362 g y 25°C durante 10 min previamente a tomar la alícuota que se inyecta en el cromatógrafo.

Análisis cromatográfico de los perfiles proteicos

Las condiciones cromatográficas para realizar los análisis (por triplicado) de las muestras fueron:

- Columna: (i) relleno monolítico con tamaño de partícula de 10 μm , 100 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno y (ii) relleno de perfusión con tamaño de partícula de 10 μm , 50 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno.
- Gradiente: (i) para la columna monolítica de 5 a 30% (v/v) de fase móvil B en 6.0 min y de 30 a 85% (v/v) de fase móvil B en 2.0 min seguido de un gradiente lineal inverso de 85 a 5% de fase móvil B en 1 min para volver la columna a las condiciones iniciales y (ii) para la columna perfusiva de 5 a 25% (v/v) de fase móvil B en 1.7 min y de 25 a 45% (v/v) de fase móvil B en 0.8 min seguido de un gradiente lineal inverso de 85 a 5% de fase móvil B en 1 min para volver la columna a las condiciones iniciales.
- Fases móviles: Fase móvil A, agua grado HPLC con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético; Fase móvil B, acetonitrilo grado HPLC con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético.
- Temperatura de la columna: (i) para la columna monolítica, 30°C y (ii) para la columna perfusiva, 60°C.
- Flujo: 3 mL/min para las columnas monolítica y perfusivas.
- Detección: UV a 280 nm (longitud de onda selectiva de los aminoácidos aromáticos: tirosina y triptófano)

Los perfiles proteicos obtenidos (véase la Figura 1) se caracterizan por 15 picos en menos de 8 min (columna monolítica) y por 14 picos en menos de 3 min (columna perfusiva). Los picos característicos que permiten diferenciar entre soja transgénica y no transgénica son los picos 8 y 9 (columna monolítica) y 3 y 4 (columna perfusiva). Sin embargo, para contenidos de material transgénico pequeños es necesario complementar con técnicas de análisis multivariante para un mayor aseguramiento de los resultados.

Aplicación de técnicas de análisis multivariante

La aplicación de las técnicas de análisis multivariante se realizó sobre el porcentaje en área de pico que se determina:

$$\%A (\text{pico } i) = \frac{A_i}{A_T} \quad \text{siendo } A_T = \sum_{i=1}^n A_i \quad \text{con } n = 15 (\text{monolítico}) \text{ o } 14 (\text{perfusivo})$$

El análisis cluster (método Ward) permite diferenciar entre las muestras de habas de soja no transgénicas y transgénicas y los patrones de soja certificados que tienen un contenido pequeño de soja transgénica (véase la Figura 2).

El análisis discriminante permite realizar un modelo matemático con las 16 muestras cuyo carácter transgénico o no transgénico es conocido resultando en la correcta clasificación de las 16 muestras. Aunque ambos procedimientos muestran el mismo potencial de clasificación, el perfusivo es más rápido que el monolítico.

Aplicación industrial

Tanto a los fabricantes como a la administración les interesa que existan procedimientos analíticos sencillos, rápidos y asequibles que permitan diferenciar entre soja transgénica y no transgénica para cumplir con la normativas existentes. Igualmente, los laboratorios de control (incluyendo los de aduanas) podrían hacer uso de esta metodología para evaluar partidas de soja que provengan de países en los que el cultivo de soja transgénica está permitido. Por ejemplo, España importa varios millones de toneladas de soja al año procedentes de EEUU, Argentina, etc.

Bibliografía

- [1] **Burton**, J. W., Soyabean (*Glycine max* (L) Men), *Field Crops Research*, 1997, 53.
- [2] **Kwanyuen**, P.; **Pantalone**, V. R.; **Burton**, J. W.; **Burton** R. F., A new approach to genetic alteration of soybean protein composition and quality, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 983 -987.
- [3] **Saroha**, M. K.; **Sridahr**, P.; **Malik**, V. S. Glyphosate-tolerant crops: genes and enzymes, *J Plant Biochem. Biotechnol.* 1998, 7, 65-72.
- [4] Monsanto Company History, Monsanto Web Site (<http://monsanto.com>).
- [5] **Lawton**, K., Roundup of a market, *Farm Industry News*, 1999, February, 4-8.
- [6] **Clark**, E. A., Environmental risks of genetic engineering, *Euphytica* 2006, 148, 47-60.
- [7] **Phipps**, R. H.; **Beever**, D. E., New technology: issues relating to the use of genetically modified crops, *J. Anim. Feed Sci.* 2000, 9, 543-56.
- [8] **Owen**, M. D. K., Current use of herbicide-resistant soybean and corn in the USA, *XIVth International Plant Protection Congress*, 1999.
- [9] **Aumaitre**, A., Safety assessment and feeding value for pigs, poultry and ruminant animals of pest protected (Bt) plants and herbicide tolerant (glyphosate, glufosinate) plants: interpretation of experimental results presented worldwide on GM plants, *Ital. J. Anim. Sci.* 2004, 3, 107-121.
- [10] Regulation (EC) N° 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.
- [11] **Demeke**, T.; **Perry**, D. J.; **Scowcroft**, W. R., Adventitious presence of GMOs: scientific overview for Canadian grains, *Canadian J. Plant Sci.* 2006, 86, 1-23.
- [12] **García-Cañas**, V.; **Cifuentes**, A.; **González**, R., Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44, 425-436.
- [13] **Popping**, B.; **Broll**, H., Detection of genetically modified foods-past and future, *L'Actualité Chimique* 2001, 11, 3-12.
- [14] **Ocaña**, M. F.; **Fraser**, P. D.; **Patel**, R. K. P.; **Halket**, J. M.; **Bramley**, P. M., Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 319-328.
- [15] **García**, M. C.; **Torre**, M.; **Marina**, M. L., Characterization of commercial soybean products by conventional and perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography and multivariate analysis, *J. Chromatogr. A*, 2000, 881, 47-57.
- [16] **García-Ruiz**, C.; **García**, M. C.; **Cifuentes**, A.; **Marina**, M. L., Characterization and differentiation of diverse transgenic and nontransgenic soybean varieties from CE protein profiles, *Electrophoresis* 2007, 28, 2314-2323.
- [17] **Rodríguez-Nogales**, J. M.; **Cifuentes**, A.; **García**, M. C.; **Marina**, M. L., Characterization of protein fractions from Bt-transgenic and non-transgenic maize varieties using perfusion and monolithic RP-HPLC. Maize differentiation by multivariate analysis, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 3835-3842.

ES 2 324 758 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimientos cromatográficos **caracterizados** porque permiten la diferenciación rápida entre soja transgénica (con tolerancia al glifosato) y no transgénica por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en fase inversa empleando fases estacionarias monolíticas y perfusivas mediante el análisis de perfiles proteicos.

10 2. Procedimientos, según la reivindicación 1, que comprenden un tratamiento de muestra sencillo en el que las habas de soja se trituran, se toma una cantidad adecuada para conseguir una concentración de ~ 5 mg/mL en un medio compuesto por agua:acetonitrilo (ACN) (80:20, v/v), se sonica (10 min a 25°C) y se centrifuga (10 min a 3362 g y 25°C) previamente al análisis cromatográfico.

15 3. Procedimientos, según la reivindicación 1, que consisten en un gradiente binario y lineal en dos etapas con ACN-agua-ácido trifluoroacético (TFA) a un flujo de 3 mL/min que se basan en 5-30% (v/v) B en 6.0 min y 30-85% (v/v) B en 2.0 min para la columna monolítica y 5-25% (v/v) B en 1.7 min y 25-45% (v/v) B en 0.8 min para la de perfusión siendo la fase A: agua + TFA 0.1% (v/v) y la fase B: ACN + TFA 0.1% (v/v)

20 4. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque la separación de las proteínas de soja se realiza a una temperatura de 30°C para la columna monolítica y de 60°C para la de perfusión.

25 5. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque la detección de las proteínas de soja (aminoácidos aromáticos) se realiza por detección UV a 280 nm.

30 6. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** por servir para hacer un cribado rápido que permite diferenciar entre soja transgénica y no transgénica teniendo en cuenta los picos 8 y 9 para la columna monolítica y los picos 3 y 4 para la columna de perfusión.

35 7. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque requieren el empleo de técnicas multivariantes de análisis cluster (método de Ward) y de análisis discriminante para una diferenciación más rigurosa entre soja transgénica y no transgénica especialmente en el caso de que el contenido en material transgénico es pequeño.

40 8. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** por ser susceptibles de ser usados con otros tipos de soja transgénica, incluyendo los denominados organismos transgénicos de nueva generación.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

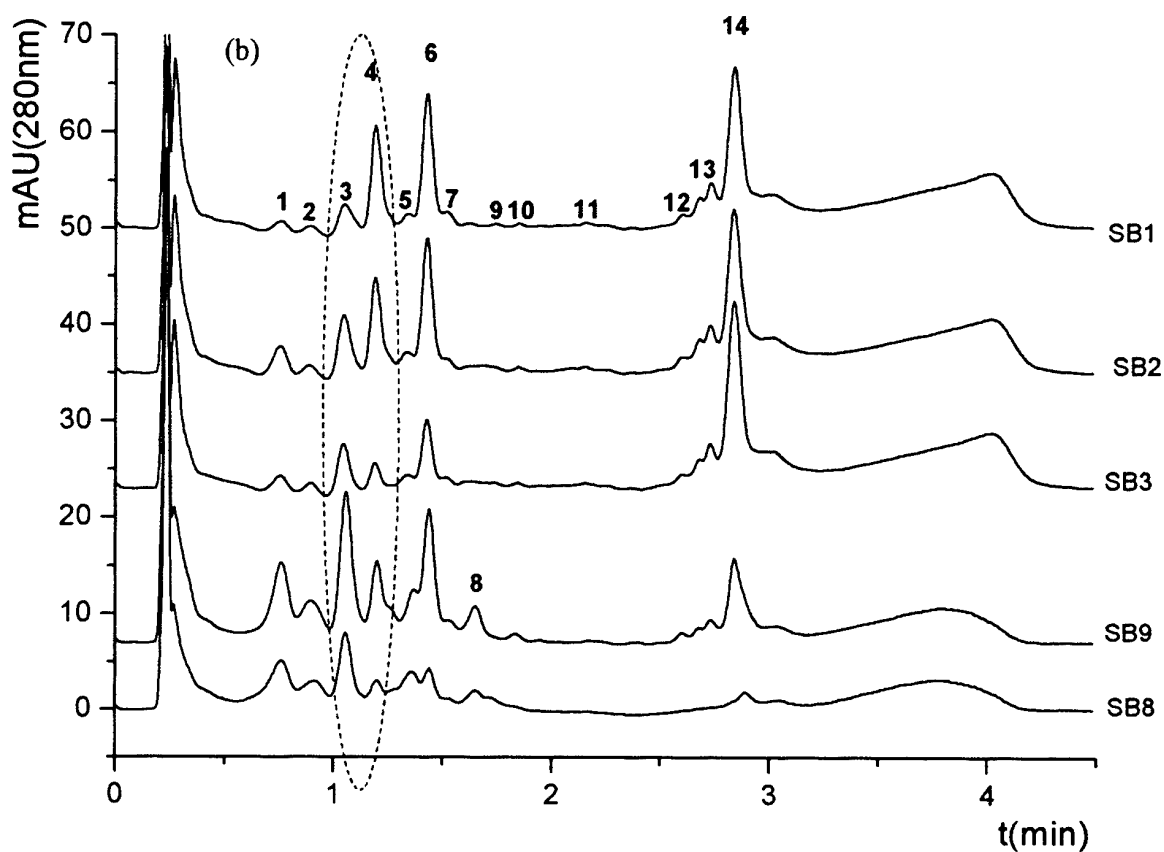
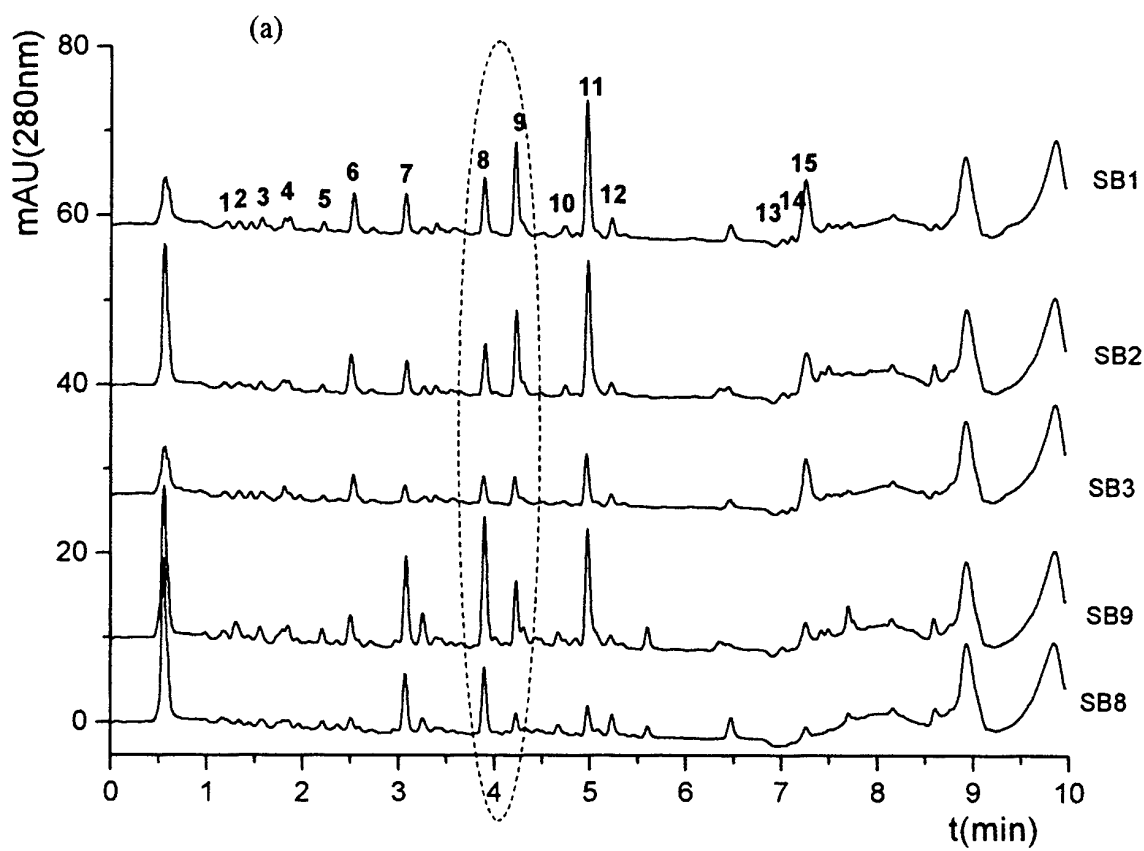
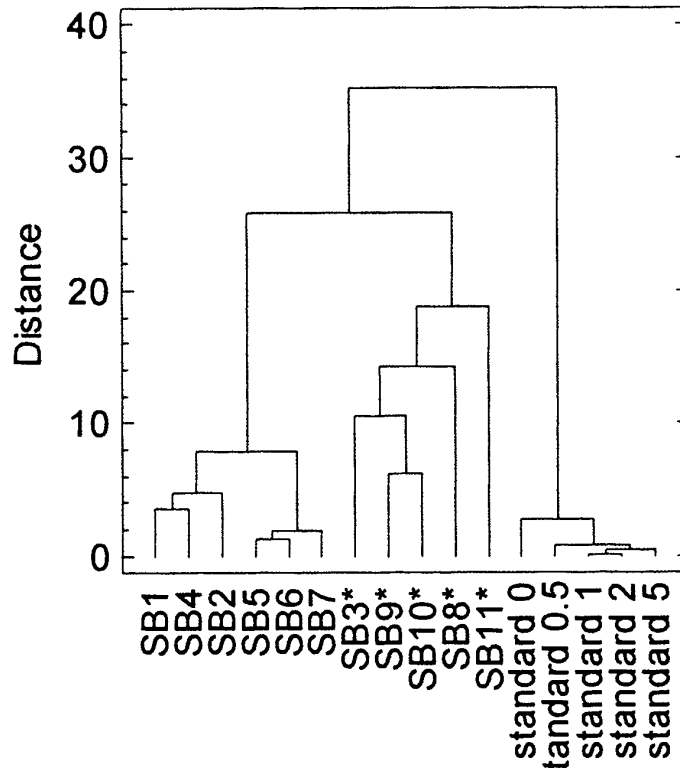
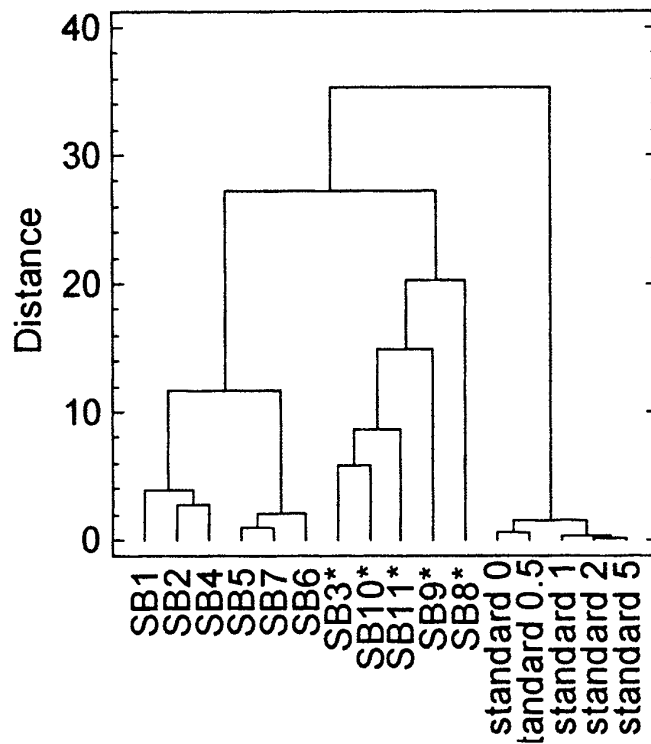


Figura 2
Procedimiento monolítico



Procedimiento perfusivo





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 758

② Nº de solicitud: 200703123

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07K 1/20 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RODRÍGUEZ-NOGALES J.M., et al. Characterization of protein fractions from Bt-transgenic and non-transgenic maize varieties using perfusion and monolithic RP-HPLC. Maize differentiation by multivariate analysis. 21.04.2007. J. Agric. Food Chem. Vol. 55, páginas 3835-3842. Página 3835.	1,7,8
A	GARCÍA-RUIZ C., et al. Characterization and differentiation of diverse transgenic and nontransgenic soybean varieties from CE protein profiles. Julio 2007. Electrophoresis. Vol. 28, páginas 2314-2323.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.07.2009

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-6	SÍ
	Reivindicaciones 1, 7, 8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RODRÍGUEZ-NOGALES J.M., et al. Characterization of protein fractions from Bt-transgenic and non-transgenic maize varieties using perfusion and monolithic RP-HPLC. Maize differentiation by multivariate analysis.	21-04-2007
D02	GARCÍA-RUIZ C., et al. Characterization and differentiation of diverse transgenic and nontransgenic soybean varieties from CE protein profiles.	07-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga un procedimiento cromatográfico para la diferenciación rápida entre soja transgénica y no transgénica mediante HPLC en fase inversa (reivindicaciones 1 - 8).

El documento D01, que refleja el estado de la técnica mas cercano, divulga la caracterización de maíz modificado genéticamente y no modificado, mediante RP-HPLC.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

La solicitud de patente, reivindica un método cromatográfico para diferenciar entre soja transgénica y no transgénica mediante HPLC en fase inversa empleando fases estacionarias monolíticas y perfusivas (reivindicaciones 1 y 8) y técnicas multivariantes de análisis cluster y de análisis discriminante (reivindicación 7).

El documento D01, divulga (en la página 3835) como la diferenciación de maíz transgénico y no transgénico es posible mediante RP-HPLC empleando fases estacionarias monolíticas y perfusivas. Dicho documento, además divulga la realización de un análisis discriminante para clasificar el maíz en transgénico y no transgénico.

La diferencia entre la solicitud de patente y el documento D01, reside en la naturaleza del material a analizar, el hecho de emplear el mismo método para analizar soja en lugar de maíz, resultaría evidente para un experto en la materia. Por tanto, las reivindicaciones 1, 7 y 8 de la solicitud de patente, presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.