

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

1. Un producto de tabaco con niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) generado a partir de una planta de tabaco modificada que comprende:
una enzima nitrato reductasa desregulada que tiene la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 4 o fragmentos de la misma, la cual comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 523 de dicha secuencia.
2. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 1, en donde en donde la posición 523 del aminoácido de secuencia SEQ ID NO: 4 se sustituye por ácido aspártico.
3. El producto de tabaco de conformidad con las Reivindicaciones 1 o 2, en donde la enzima nitrato reductasa desregulada es una enzima nitrato reductasa que está activa constitutivamente.
4. El producto de tabaco de conformidad con las Reivindicaciones 1, a 3, en donde el producto de tabaco comprende material de planta de una planta de tabaco de la especie *Nicotiana tabacum*.
5. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polinucleótido que codifica la enzima nitrato reductasa desregulada es un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de nitrato reductasa modificada.
6. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 5, en donde el polinucleótido heterólogo está enlazado a un promotor que no está asociado de manera natural con un gen de nitrato reductasa endógena.
7. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 6, en donde el promotor es el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S.

8. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polinucleótido que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada comprende una secuencia de polinucleótido SED ID NO. 5.
9. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) en comparación con un producto de tabaco derivado de una planta de tabaco de control en la que la enzima nitrato reductasa no se desreguló.
10. El producto de tabaco de la Reivindicación 9, en donde el nivel de al menos una TSNA en el producto de tabaco es menor en comparación con un nivel de control para al menos una TSNA, donde al menos una TSNA se selecciona del grupo que consiste en N-nitrosornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), N-nitrosoanabasina (NAB), N-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas.
11. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 10, en donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 50%.
12. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 11, en donde el nivel de NNN se reduce en 90%
13. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 12, en donde el nivel de NNK se reduce en 66%.
14. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 13, en donde el nivel de NAB se reduce en 92%.
15. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 10 a 14, en donde el nivel de NAT se reduce en 88%.
16. El producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la planta de tabaco comprende además un gen de la vía de nornicotina modificado.

17. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 16, en donde el gen de la vía de nornicotina modificado comprende un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450.
18. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 16 o 17, en donde la planta de tabaco comprende un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado.
19. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 18, en donde el gen CYP82E4 modificado o gen CYP82E10 modificado están inactivados.
20. Un método para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada, que comprende:
 - (a) modificar una planta de tabaco para que comprenda:
 - una enzima nitrato reductasa desregulada que tiene la secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 4 o fragmentos de la misma, la cual comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 523 de dicha secuencia.
 - (b) cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada; y
 - (c) producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.
21. El método de acuerdo con la Reivindicación 20, en donde la posición 523 del aminoácido de secuencia SEQ ID NO: 4 se sustituye por ácido aspártico.
22. El método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 20 a 21, en donde la enzima nitrato reductasa desregulada es un gen nitrato reductasa endógeno que ha sido modificado por un sistema de edición de genomas o por un mutagen.
23. El método de acuerdo con la Reivindicación 22, en donde el sistema de edición de genomas comprende un sistema basado en CRISPR/Cas diseñado, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada.

24. El método de acuerdo con la Reivindicación 23, donde los niveles de TSNA se miden en el humo obtenido de la combustión de hojas de la planta de tabaco.
25. El producto de tabaco de conformidad con la Reivindicación 24, donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 70%.

Señora Directora

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente No. NC2017/0004076

Asunto: Solicitud de patente para: REDUCCIÓN DE NITROSAMINAS ESPECÍFICAS DEL TABACO MEDIANTE LA ALTERACIÓN DE LA VÍA DE ASIMILACIÓN DE NITRATO

Solicitante: NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY; PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.

Fecha de solicitud: 26 de abril de 2017

RESPUESTA A PRIMER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio No. 14672, notificado por fijación en lista el 07 de diciembre de 2018, estando en el plazo establecido para esto toda vez que solicité prórroga el 27 de febrero de 2019.

I. MODIFICACIONES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

En respuesta al examen de patentabilidad aportó un Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 25 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

- Las Reivindicaciones 2 – 5, 8 – 9 , 11, 16 y 18 (antiguas Reivindicaciones 2 – 5, 8, 11, 13, 20 y 22) han sido enmendadas para reclamar "El producto del tabaco de conformidad con (...)".
- Se han modificado las dependencias de las Reivindicaciones 6 y 7.
- Las antiguas Reivindicaciones 22 a 25 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 9, 10, 14 y 15, las cuales han sido modificadas para ser dependientes de la Reivindicación 20 de método (antigua Reivindicación 24).

Me permito resaltar que estas modificaciones se ajustan completamente a lo establecido por el Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000, ya que no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

II. EN CUANTO A LA CLARIDAD Y CONCISIÓN

En primer lugar, el Examinador señala que la Reivindicación 1 carece de claridad y sustento al mencionar que la posición 523 de la enzima nitrato reductasa (NR) puede ser sustituida por aminoácidos diferentes a ácido aspártico, toda vez que los ejemplos de la solicitud evidencian una sustitución S523D en dicha posición en enzimas nitrato reductasa truncadas y completas.

Sobre este particular, señalo que una persona normalmente versada en la materia apreciará que el sitio de fosforilación presente en la posición 523 del polipéptido de la enzima nitrato reductasa se elimina cuando el residuo de serina es reemplazado por cualquier otro aminoácido. Lo anterior ocurre debido a que la enzima quinasa actúa preferencialmente sobre el grupo -OH presente en las cadenas laterales del residuo serina, de esta manera una sustitución por cualquier aminoácido diferente a Ser generará que dicho sitio de fosforilación se pierda. Esto es consistente con las enseñanzas de las páginas 36 (líneas 15 a 18), 39 (línea 24), 40 (líneas 1 a 3) de la presente solicitud, en donde se establece que el objetivo de la mutación de sustitución en la posición 523 es eliminar dicho sitio de fosforilación. Por esta razón, a pesar de que los ejemplos de la presente solicitud describan resultados obtenidos a partir de una planta de tabaco con una enzima nitrato reductasa (NR) específicamente modificada en S523D, restringir la materia reclamada a realizaciones que únicamente comprendan una sustitución S523D permitiría que terceros impunemente usen el concepto inventivo de la presente invención, dado que una persona normalmente versada en la materia se vería motivada a realizar una sustitución en dicha posición obteniendo un efecto técnico similar al alcanzado con una sustitución S523D, logrando eliminar la fosforilación como control post-traducciona l de la enzima NR.

Por tanto, teniendo en cuenta que el Artículo 30 de la Decisión 486 señala que la materia reclamada debe tener debido soporte en el Capítulo Descriptivo de la solicitud y no en los

ejemplos de la misma, considero como superada la objeción señalada, en vista de que la materia allí reclamada (enzima NR truncada o completa) cuenta con debido soporte en las páginas 36 (líneas 21 a 23) y 37 (líneas 15 a 17). Particularmente, teniendo en cuenta que la legislación vigente no establece como requerimiento legal la presentación de evidencia experimental respecto de cada una de las realizaciones abarcadas bajo el alcance de una solicitud y que una persona normalmente versada en la materia podría realizar una sustitución en dicha posición por cualquier otro aminoácido obteniendo un efecto técnico similar al divulgado en la presente invención.

Por otro lado, el Examinador indica que la Reivindicación 4 no es clara ni concisa, toda vez que no se refiere de manera específica a la planta DH98-325-6#775 de la variedad Burley y argumenta que sin la sustitución W329Stop presente en la enzima CYP82E4 de dicha planta el producto reclamado no tendría las características técnicas descritas.

En cuanto a la objeción arriba detallada, deseo enfatizar una vez más sobre lo divulgado en la página 94 del Capítulo Descriptivo en donde se indica que las plantas de tabaco de la variedad Burley tienen un fenómeno denominado conversión de nicotina, en el cual el gen *CYP82E4* se activa espontáneamente dando lugar a una alta proporción de plantas que acumulan elevados niveles nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA). De esta manera, las mediciones de los niveles de TSNA en plantas de la variedad de tabaco Burley no serían comparables entre sí dado que la activación de dicho gen ocurre de manera diferencial y no previsible entre individuos. Esto quiere decir, que si no se controla la activación espontánea del gen *CYP82E4*, los niveles de TSNA medidos no corresponderán a nitrosaminas producidas durante la etapa de curado de la hoja de tabaco, como normalmente ocurre en el proceso de obtención de un producto de tabaco (Capítulo Descriptivo: página 2, líneas 11 y 12), sino de la activación espontánea y no predecible de dicho gen en una variedad particular de la planta de tabaco en cualquier etapa del proceso de producción, lo que interferiría con la interpretación de los datos de TSNA y la evaluación del efecto provisto por la invención, como se explica en el Ejemplo 2 de esta solicitud.

En vista de lo anterior, una vez más señalo que la línea de planta referida por el Examinador es empleada para minimizar las fuentes de error en la medición de TSNA requeridas para validar adecuadamente los efectos técnicos de la presente invención. Por

consiguiente, el emplear la línea DH98-325-6#775 corresponde a un mecanismo de validación del efecto técnico de la presente invención, más no limita de ninguna manera el concepto inventivo de la presente solicitud, el cual abarca un producto de tabaco que comprende material vegetal de una planta de tabaco de la especie *N. tabacum*, como se describe en la Reivindicación 4.

Por otro lado, señalo que una persona normalmente versada en la materia apreciaría que la enzima NR cumple la misma función sin importar la línea de planta en la cual se evidencie su actividad. Por lo tanto, considerando que el nitrato es reducido a nitrito por la NR, los niveles de nitrato de la planta decrecerán cuando la enzima esté desregulada.

Adicionalmente, el Examinador señala que las antiguas Reivindicaciones 9, 10 y 14 no son claras dado que comprenden características que no definen el producto de tabaco.

Respecto de lo anterior, amablemente solicito al Examinador considerar como superada la objeción previamente mencionada, dado que las antiguas Reivindicaciones 9, 10 y 14 fueron reformuladas para reclamar un método de acuerdo con la Reivindicación 20 (antigua Reivindicación 24), de manera que las expresiones contenidas en dichas reivindicaciones delimitan el método reclamado en cuanto a que indican el medio por el cual se modifica la secuencia de la enzima NR a fin de obtener el producto de tabaco deseado.

Por último, el Examinador indica que las Reivindicaciones 16 a 18 (antiguas Reivindicaciones 20 – 22) no tienen sustento, dado que mencionan que “(...) la planta de tabaco comprende además un gen de la vía de nornicotina modificado”, “(...) el gen de la vía de nornicotina modificado comprende un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450”, y “(...) la planta de tabaco comprende un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado”, respecto de lo cual el Examinador indica que no se evidencia el desarrollo de ninguna modificación en dichos genes, dado que en el Capítulo Descriptivo se emplea una planta DH98-325-6#775 la cual incluye una sustitución W329Stop en la secuencia de aminoácidos de la enzima CYP82E4.

Sobre este particular, en primer lugar deseo hacer hincapié en que la Solicitante tiene el derecho de abarcar la totalidad del concepto inventivo de la solicitud, sin que se requiera la presentación de evidencia experimental puntual para dar soporte a cada una de las

realizaciones derivadas del concepto inventivo de la solicitud, toda vez que la materia reclamada tenga debido soporte en el Capítulo Descriptivo, como ocurre en la presente solicitud en las páginas 4 (líneas 19 a 23), 60 (línea 24), 61 (línea 1 a 2).

Así mismo, deseo poner de presente que la página 60 (líneas 15 a 19), indica que el polipéptido de NR desregulada puede encontrarse en combinación con un gen precursor de alcaloide modificado, lo cual puede producir una reducción aún mayor en la acumulación de N-nitrosornicotina en comparación con el uso de NR desregulada o un gen precursor de alcaloide modificado por separado. Por lo tanto, afirmo que el emplear genes nicotina desmetilasa modificada como citocromo P450, CYP82E4 y CYP82E10 en conjunto una NR desregulada hace parte del concepto inventivo de la presente solicitud y además cuenta con debido soporte en el Capítulo Descriptivo, razón por la cual, en virtud del Artículo 30 de la Decisión 486 de 2000 amablemente se solicita que la objeción aquí discutida sea tenida como superada.

En conclusión, considero que el Capítulo Reivindicatorio modificado adjunto cumple con todos los requisitos de claridad y concisión, ajustándose así a los lineamientos del Artículo 30 de la Decisión 486, ya que cualquier persona del oficio normalmente versada en la materia está en completa capacidad de reproducir la invención sin ambigüedad alguna.

III. ESTADO DE LA TÉCNICA

El Examinador indica que los siguientes documentos son relevantes para la patentabilidad de las Reivindicaciones 1 – 25 de la presente solicitud:

No.	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	WO2013140155	<i>“Transgenic plants with altered nitrate levels in leaves</i> <i>”</i>	26 Septiembre 2013
D2	Art. 1	<i>“Posttranslational regulation of nitrate reductase</i> <i>strongly affects the levels of free amino acids and</i> <i>nitrate, whereas transcriptional regulation has only</i> <i>minor influence”</i>	Marzo 2006

IV. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NIVEL INVENTIVO

El Examinador sostiene la objeción respecto del nivel inventivo del producto reclamado en las Reivindicaciones 1 – 19 (antiguas Reivindicaciones 1 – 23), así como del método de conformidad con las Reivindicaciones 20 a 25 (antiguas Reivindicación 24 – 25) en vista de las enseñanzas de D1 y D2. Adicionalmente, el Examinador indica que Lu *et al.* (2016)¹ revela que la sustitución S521D del documento D2 es equivalente a la sustitución S523D, en vista de lo cual afirma que una modificación como la realizada en la presente invención carecería de toda altura inventiva. Asimismo, el Examinador asegura que las reivindicaciones dependientes no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente puedan conferir nivel inventivo a la materia reclamada en la presente solicitud.

Respecto de lo anterior, deseo poner de presente que si bien D1 menciona en la sección de antecedentes que la regulación de la actividad de genes como la nitrito y nitrato reductasas es un punto crítico para controlar la asimilación de nitrógeno en la planta, dicho documento plantea como principal estrategia para evitar la acumulación de nitrato, el aumento y estimulación de la re-distribución de nitrógeno en la planta (D1: página 2, líneas 31 a 36). Es por esto que D1 se enfoca en proveer un constructo genético que codifica un polipéptido con actividad transportadora de nitrato bajo el control de un promotor constitutivo, para así lograr la sobre expresión de dicho gen y reducir la concentración de TSNAs en plantas de tabaco. Por lo tanto, indico que, si bien D1 menciona como posible estrategia para favorecer la reducción de TSNAs la regulación de la enzima NR, entre otros posibles genes; señalo que las enseñanzas generales de este documento no motivarían a la persona normalmente versada en la materia a concluir específicamente que la desregulación de la enzima NR puede servir como mecanismo de control de los niveles de TSNAs, particularmente recurriendo a la eliminación del sitio de regulación por fosforilación en la posición S523 de la NR de *N. tabacum* con secuencia SEQ ID NO.: 4; lo cual es una enseñanza que no supe D2 como se discutirá a continuación.

¹ Lu J, Zhang L, Lewis RS, et al. *Expression of a constitutively active nitrate reductase variant in tobacco reduces tobacco-specific nitrosamine accumulation in cured leaves and cigarette smoke*. Plant Biotechnol J. 2016;14(7):1500-10.

En la página 1085 (col. der.) de D2 los autores de este artículo afirman que el sitio de regulación por fosforilación en la posición S543 de la enzima NR en espinaca corresponde a la posición S521 en la enzima NR de *N. tabacum*. Dicha aseveración está fundamentada en los artículos Lillo *et al.*, 2003³ y Lea *et al.*, 2004⁴ en los cuales una vez más la posición S543 de la NR de espinaca es inequívocamente referida como equivalente a la posición S521 en la NR de la planta de tabaco. Lo anterior evidencia que D2 no brinda ninguna enseñanza ni mención respecto de una sustitución diferente a la realizada en la posición S521 en dicho documento y, por lo tanto, D2 ni la literatura científica sobre la cual se basa, proveen ninguna mención o referencia que indique o siquiera sugiera una sustitución en la posición S523. Con base en lo anterior, señalo que la combinación de las enseñanzas de D2 y D1 no podría sugerir el objeto de la presente invención, teniendo en cuenta que dichos documentos fallan en sugerir una sustitución en la posición S523 de la secuencia SEQ ID NO.: 4 de la NR.

Es por esto que el Examinador recurre a la combinación adicional de un tercer documento: Bachmann *et al.*, 1996, que cita en una nota al pie de página en los Oficios del primer y segundo examen sustantivo (Oficios No. 6986: p. 14 y No. 14672: p. 9), respecto del cual afirma que aporta las enseñanzas suficientes para concluir que *“la sustitución S521D del documento D2 y la sustitución S523D de la solicitud, refieren a la misma sustitución por mutación en la secuencia de aminoácidos de la enzima nitrato reductasa”*. Lo anterior en primera instancia resalta que el Examinador tuvo que recurrir a un tercer documento para evaluar el nivel inventivo de la solicitud, lo cual en sí mismo es un indicio de la existencia de un paso inventivo en la presente invención, según lo divulgado en la sección 2.13.5.3.1 de la *Guía Colombiana para el Examen de Solicitudes de Patente* (GCESP)².

Los autores de los artículos Lillo *et al.*, 2003³ y Lea *et al.*, 2004⁴ (sobre los cuales basa D2 la correspondencia de sustituciones entre las enzimas NR de espinaca y la planta de tabaco) citan las enseñanzas de Bachmann *et al.*, 1996 y aún en vista de éstas sostienen que la posición S543 de la NR de espinaca corresponde a la posición S521 en la planta de tabaco. De esta manera, se evidencia que, contrario a lo aseverado por el Examinador, una persona experta en la técnica que combine las enseñanzas de D1, D2 y Bachmann *et al.*, 1996 no deduciría que la posición referida como S521 es *“incorrecta”* y debería

² Superintendencia de Industria y Comercio (2014) *“GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD”*. Sección 2.13.5.3.1, p. 135. Bogotá, Colombia.

corresponder a otro residuo de la secuencia de NR, teniendo en cuenta además que la Figura 8 de Bachmann *et al.*, 1996 sustenta que en la posición 521 de la enzima NR de la planta de tabaco hay un residuo de serina.

En consecuencia, el Examinador se ve en la necesidad de referenciar un cuarto documento para sustentar su posición y en el Oficio No. 14672 (p. 18) cita el artículo Lu *et al.* (2016)² sobre el cual fundamenta “*que la sustitución S521D del documento D2 y la sustitución S523D de la solicitud son las mismas, y por tanto, cualquier efecto asociado a dicha sustitución sería esencialmente equivalente*”.

Sobre este particular, deseo llamar la atención del Examinador sobre la fecha de publicación del artículo *Expression of a constitutively active nitrate reductase variant in tobacco reduces tobacco-specific nitrosamine accumulation in cured leaves and cigarette smoke*². Como bien lo señala el Examinador, dicho artículo fue publicado en el año 2016, es decir, en una fecha posterior a las fechas de prioridad reivindicadas en la presente solicitud: prioridad No. 14186705.1 del 26 de septiembre de 2014 y No. 14194798.6 del 25 de noviembre de 2014 de la Oficina Europea de Patentes (CPO). Lo anterior implica que en el estado de la técnica al momento de presentar la primera solicitud en la jurisdicción de la cual se reivindica la prioridad no existía una divulgación a partir de la cual se pudiera anticipar un error en la numeración de la posición S521 divulgada en D2, es decir su equivalencia con la posición S523 en la NR de *N. tabacum* discutida en la presente solicitud. Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia no podría inferir que D2 se estaría refiriendo a la posición S523 y no a la posición S521 cuando a lo largo de dicho documento reiteradamente evidencia ésta última como única posición candidato para generar la desregulación por fosforilación de la enzima NR. Dicha aseveración es de igual manera sustentada en los artículos Lillo *et al.*, 2003³, Lea *et al.*, 2004⁴, como lo indiqué anteriormente, los cuales son citados en D2 para fundamentar que la posición 543 en la NR de espinaca corresponde a la posición 521 de la misma enzima en plantas de tabaco, como se evidencia a continuación:

³ Lillo C, Lea US, Leydecker M-T, Meyer C (2003) *Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation*. Plant J 35: 566–573

⁴ Lea US, ten Hoopen F, Provan F, Kaiser WM, Meyer C, Lillo C (2004) *Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and roots tissue*. Planta 219: 59–65

“Se conoce que la NR es regulada de manera post-traducciona mediante la fosforilación de un residuo de serina conservado, Ser 543 en espinaca (Douglas et al. 1995; Bachmann et al. 1996) y Ser 534 en Arabidopsis (Su et al. 1996), correspondientes a Ser 521 en Nicotiana tabacum.” - Lillo et al., 2003; p. 566, col. izq. & Lea et al., 2004; p. 59, col. der. (texto traducido)⁵.

Como se puede evidenciar en el texto arriba expuesto, los dos artículos sobre los cuales se fundamenta D2 para indicar que la posición S543 de la enzima NR de espinaca es equivalente a la posición S521 de la NR de *N. tabacum* se basan en el artículo de Bachmann et al. (1996), el cual es referenciado por el Examinador como evidencia suficiente para inferir que la posición S543 de la NR de la espinaca en realidad corresponde a la posición S523 de dicha enzima en *N. tabacum* y no a la posición S521. Sin embargo, dicha precisión no es hecha en D2 ni en los artículos sobre los cuales se basa dicho documento para establecer la correspondencia de posiciones entre las enzimas NR. Esto implica que los autores de D2 a pesar de conocer las enseñanzas de Bachmann et al. (1996), reiteradamente y a lo largo de diferentes artículos afirman que la posición correspondiente a S543 en la NR en espinaca sería la posición S521 en *N. tabacum* y no la S523.

Por esta razón, señalo que a la fecha de presentación de la solicitud de la cual se reivindica prioridad, una persona normalmente versada en la materia no se vería motivada en manera alguna a sospechar que la correspondencia de la posición de fosforilación en *N. tabacum* referida en D2 no corresponda a S521 sino a S523, dado que aún en vista del artículo que el Examinador cita como el que esclarece dicho error, los autores de D2 reiteran la correspondencia de la posición con S521 con el sitio regulatorio referido en espinaca, ajustándose a lo ilustrado en el alineamiento de Bachmann et al. (1996) en donde se evidencia un residuo de serina en la posición 521 y de esta manera, haciendo más difícil que una persona normalmente versada en la materia concluya que hay un error en la referenciación de las posiciones de la enzima NR en D2, como lo discutí anteriormente.

⁵ Texto original:

“NR is known to be regulated post-translationally by phosphorylation on a conserved Ser residue, Ser 543 in spinach (Douglas et al. 1995; Bachmann et al. 1996) and Ser 534 in Arabidopsis (Su et al. 1996), corresponding to Ser 521 in Nicotiana tabacum.” - Lillo et al., 2003; p. 566, col. izq.

“NR is known to be regulated post-translationally by phosphorylation of a conserved serine residue, Ser 543 in spinach (Douglas et al. 1995; Bachmann et al. 1996) and Ser 534 in Arabidopsis (Su et al. 1996), corresponding to Ser 521 in Nicotiana tabacum.” - Lea et al., 2004; p. 59, col. der.

Por lo tanto, enfatizo en que la única referencia que tendría el experto en la técnica para inferir que la mención a S521 en D2 correspondería a un error, es el artículo de Lu *et al.* (2016)² el cual, como lo mencioné anteriormente, es posterior a la fecha de prioridad reivindicada por la presente solicitud y por tanto no hacía parte del estado de la técnica al momento de formular la presente invención. Con base en lo anterior, señalo que una persona normalmente versada en la técnica no se vería motivada a inferir que la posición referida en D2 como S521 pueda corresponder a la posición S523 a la luz de las enseñanzas del arte previo citado o en consideración de los documentos relacionados existentes en el estado de la técnica a la fecha de presentación de la solicitud de la cual se reivindica prioridad, como lo expuse anteriormente.

Por lo tanto, el efecto técnico, así como el nivel inventivo de la presente invención deben ser reconocidos en vista de que el Examinador falla en sustentar la presunta falta de nivel inventivo de la presente invención haciendo uso de una única pareja documental y se ve en la necesidad de citar un tercer y un cuarto documento para demostrar cómo una persona normalmente versada en la materia podría llegar a elucidar una equivocación en la numeración de las posiciones de dicha enzima. En vista de lo anterior, la única evidencia válida para sustentar lo que el Examinador expone es un documento que no hace parte del estado de la técnica al momento de presentar la solicitud por primera vez.

Adicionalmente, deseo poner de presente que Bachmann *et al.* (1996) revela que S543 de la NR de espinaca es un importante sitio de fosforilación reguladora. Sin embargo, aún si la persona versada en la materia tomara en cuenta la posición S523 de la NR de tabaco yendo en contra de las enseñanzas de D2 y no la posición S521, Bachmann *et al.* (1996) solo proporciona resultados experimentales de la actividad de dicha enzima en espinacas y únicamente muestra una secuencia de alineación de reductasas de nitrato de diferentes especies lo cual no podría considerarse como una sugerencia sólida de que la fosforilación en la posición S523 de la NR de la planta de tabaco pueda contribuir a reducir de manera significativa los niveles de nitrato en plantas. Por otro lado, D2 brinda evidencia experimental contundente de la reducción de los niveles de nitrato de *N. plumbaginifolia* cuando se lleva a cabo una sustitución S521D. De esta manera, afirmo que una persona experta en la materia habría preferido modificar la posición S521 de la NR de *N. tabacum* si buscara reducir los niveles de nitrato en dicha planta y en consecuencia los TSNAs

presentes en la misma, ya que la NR de *N. tabacum* (es decir, la SEC ID NO.: 4 de la presente solicitud) es más similar a la NR de *N. plumbaginifolia* que a dicha enzima en espinaca y hay un soporte más sólido y reciente que sugiere que dicha posición puede ser relevante para la regulación de NR en *N. tabacum*. De esta manera, señalo que el Examinador no presenta argumentos suficientes para justificar que una persona normalmente versada en la materia tomaría en cuenta las enseñanzas de un documento que no presenta evidencia experimental relevante a plantas del género *Nicotiana* (sino sobre espinaca), como Bachmann *et al.* (1996), por encima de las enseñanzas de un documento como D2, el cual presenta evidencia sólida que sustenta la eficacia de una sustitución en la posición S521 para la desregulación de NR en una planta de tabaco.

Por otro lado, deseo señalar que una fosforilación podría ocurrir en al menos 384 posibles sitios regulatorios de la actividad de NR presentes en la SEQ ID NO: 4 de la NR de *N. tabacum* de la presente solicitud, es decir, que el 42% (384/904) de los aminoácidos de dicha enzima podrían ser sitios útiles para realizar una sustitución que evite la regulación por fosforilación de la misma. Lo anterior evidencia que elucidar una posición regulatoria como la discutida en la presente invención va más allá de un hallazgo que fácilmente se pueda obtener a partir de experimentación rutinaria o estocástica y, que por el contrario, conlleva una actividad inventiva por parte de la Solicitante. Incluso si la persona experta limita su elección a las posiciones que se encuentran en +/- 10 aminoácidos respecto de S521, todavía hay 9/20 posiciones que podrían potencialmente fosforilarse. Lo anterior no resulta trivial en vista de que el trabajo experimental requerido para probar un solo mutante es extenso, lo que implica la clonación, transformación, cultivo de plantas, análisis de peso fresco, ensayos de nitrato, análisis de aminoácidos, análisis de TSNA, etc. (ver Ejemplo 1 de la presente publicación) para evidenciar tal sitio regulatorio.

Así las cosas, deseo llamar la atención del Examinador sobre las directrices de la GCESP en donde se establece que un documento carece de nivel inventivo cuando

“(...) en el estado de la técnica en su conjunto hay un segundo documento que contiene una enseñanza que indicaría (no sólo que podría indicar, sino que indicaría) a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, cómo modificar o adaptar el estado de la técnica más

cercano para resolver el problema, de la forma reivindicada, sin realizar una actividad inventiva". – GCESP, sección 2.13.5.1.⁶

En vista de todo lo anterior, la presente invención se reviste de altura inventiva teniendo en cuenta que el Examinador falla en presentar un segundo documento cuyas enseñanzas en combinación con lo divulgado en D1 indiquen de manera directa el objeto de la invención. Asimismo, el Examinador no sustenta de manera clara cómo una persona normalmente versada en la materia elucidaría el objeto de la presente invención a partir de las enseñanzas de D1 y D2, sin recurrir a terceros o cuartos documentos. Por el contrario, el Examinador cita un tercer documento para sustentar su objeción respecto de la presunta falta de nivel inventivo, documento que, como lo expliqué anteriormente, no presenta enseñanzas suficientes para elucidar que la posición S521 en realidad corresponda a la posición S523 de la enzima NR de *N. tabacum*, principalmente teniendo en cuenta que los autores de D2 y artículos allí citados sustentan la correspondencia entre las posiciones de NR S521 en *N. tabacum* y S543 en espinaca basados en el tercer artículo referido por el Examinador.

V. PETICIÓN

1. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, solicito proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

VI. ANEXOS

1. Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 25 reivindicaciones.

Señora Directora,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

⁶ Superintendencia de Industria y Comercio (2014) "GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD". Sección 2.13.5.1, p. 131. Bogotá, Colombia.

