

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una planta de tabaco con niveles reducidos de nornicotina y/o NNN, dicho método comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula vegetal que comprende un polinucleótido que incluye una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa funcional y que tiene entre el 96 % y 100% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.:2;

b) insertar un ARN antisentido transgénico que tiene una secuencia complementaria a una porción de polinucleótidos en una célula vegetal de tabaco para crear una célula vegetal transgénica de tabaco; y

c) cultivar una planta transgénica de tabaco a partir de la célula vegetal de tabaco, medir el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco transgénica, en donde una disminución en el nivel de nornicotina y/o NNN en la planta de tabaco transgénica en comparación con una planta de tabaco control es indicativo de que los niveles de nornicotina y/o NNN en dicha planta de tabaco transgénica se han reducido.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la célula vegetal de tabaco en la etapa (a) es una célula vegetal de tabaco mutante.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicha célula vegetal de tabaco mutante tiene una mutación en el gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 12 a 16, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 y se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 329, 364, 376, 382, y 458 de la sec. con núm. de ident.: 5.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde dicha mutación de CYP82E4 se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución del codón de parada por el residuo de triptófano en la posición 329 de la sec. con núm. de ident.: 5; b) una sustitución de asparagina por el residuo de lisina en la posición 364 de la sec. con núm. de ident.: 5; c) una sustitución de metionina por el residuo de valina en la posición 376 de la sec. con núm. de ident.: 5; d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 5; y e) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 458 de la sec. con núm. de ident.: 5.

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicha célula vegetal de tabaco comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 se selecciona de la sec. con núm. de ident.: 24 o 25, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 y se produce en los residuos de aminoácidos 422 o 449 de la sec. con núm. de ident.: 17,

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, en donde dicha mutación de CYP82E5 se selecciona del grupo que consiste en: a) un codón de parada sustituido por el residuo de triptófano en la posición 422 de la sec. con núm. de ident.: 17; y b) una leucina sustituida por el residuo de prolina en la posición 449 de la sec. con núm. de ident.: 17.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde dicha célula vegetal de tabaco mutante comprende una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha mutación da como resultado una reducción de la expresión o la función de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 se selecciona del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 32 a 35, en donde dicha mutación da como resultado una modificación de dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 y se produce en una posición seleccionada del

grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 79, 107, 382, 419 de la sec. con núm. de ident.: 26.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en: a) una sustitución de serina por el residuo de glicina en la posición 79 de la sec. con núm. de ident.: 26; b) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 107 de la sec. con núm. de ident.: 26; c) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 382 de la sec. con núm. de ident.: 26; y d) una sustitución de serina por el residuo de prolina en la posición 419 de la sec. con núm. de ident.: 26.

9. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicha célula vegetal mutante de tabaco comprende:

- (i) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 33 (G79S); o
- (ii) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con

núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 34 (P107S); o

- (iii) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dichas nicotina desmetilasas CYP82E10 comprenden la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 35 (P382S).
- (iv) una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E4, una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E5 y una mutación en un gen que codifica una nicotina desmetilasa CYP82E10, en donde dicha nicotina desmetilasa CYP82E4 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 13 (W329Stop), dicha nicotina desmetilasa CYP82E5 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 24 (W422Stop), y dicha nicotina desmetilasa CYP82E10 comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 32 (P419S).

10. El método de conformidad con las reivindicaciones 2 a 9, en donde dicha(s) mutación(es) es una mutación heterocigota u homocigota.

11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha célula vegetal de tabaco de la etapa (b) tiene una conversión de nicotina a nornicotina menor del 1 %.

12. Un método para producir material vegetal curado con niveles reducidos de nornicotina en ellos en comparación con un material vegetal control o niveles reducidos de al menos NNN en ellos en comparación con un material vegetal control o una combinación de estos; el método comprende las etapas de:

- (i) realizar el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
- (ii) curar el material vegetal de la planta de tabaco transgénica de la etapa (c) durante un período de tiempo de manera que los niveles de al menos nornicotina o NNN sean menores que en un material vegetal curado control.

13. Un método para producir material vegetal curado de conformidad con la reivindicación 12, en donde el material vegetal es hojas curadas o flores.

14. Un método para producir un producto de tabaco con un potencial carcinogénico reducido, que comprende las etapas de:

- (i) realizar el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- (ii) preparar un producto de tabaco de la planta transgénica obtenida en la etapa (c).

15. Un polinucleótido aislado que comprende un nucleótido con la sec. con núm. de ident.:2.

16. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos con la sec. con núm. de ident.:3.

LAG\LAG\ID-604263\WPC12770

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente NC2016/0004215

Asunto: Solicitud de patente para: REDUCCIÓN DE LA CONVERSIÓN DE
NICOTINA A NORNICOTINA EN PLANTAS

Solicitante: PHILIP MORRIS BRANDS SARL

Fecha de solicitud: 17 de noviembre de 2016

RESPUESTA A SEGUNDO EXAMEN DE PATENTABILIDAD

JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI; 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 **10337**, notificado por fijación en lista el 27 de agosto de 2018, para lo cual pedí plazo adicional el 16 de noviembre de 2018.

I. MODIFICACIONES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

En respuesta al segundo examen de patentabilidad aportó un Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 16 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

1. Se han eliminado las reivindicaciones 1 a 11 y 14;
2. Se ha eliminado la expresión “*preferiblemente*”;
3. La reivindicación 12 (nueva reivindicación 1) ha sido enmendada para reemplazar la expresión “*comprende una secuencia*” por la expresión “*incluye una secuencia*”. Así mismo, la etapa (c) de esta misma reivindicación ha sido modificada a fin de especificar que “*se cultiva una planta transgénica de tabaco a partir de la célula vegetal de tabaco*” y se ha reemplazado la expresión “*mutante*” por “*transgénica*”;
4. En la etapa (b) de la reivindicación 12 (nueva reivindicación 1) se ha reemplazado la expresión “*RNA transgénico antisentido*” por “*ARN antisentido transgénico*” a fin de darle claridad a la materia reivindicada;

5. La reivindicación 13 (nueva reivindicación 2) ha sido modificada a fin de reemplazar la expresión “*planta mutante de tabaco*” por “*célula vegetal de tabaco mutante*”;
6. Se han incluido las nuevas reivindicaciones 3 a 11, las cuales están basadas en las antiguas reivindicaciones 2 a 4 y 6 a 8;
7. Las etapas (a) y (b) de la reivindicación 15 (antigua reivindicaciones 12), han sido reemplazadas por las etapas (i) y (ii), respectivamente. De igual manera, la etapa (i) ha sido modificada para enunciar que dicho paso comprende ejecutar el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 y la etapa (ii) ha sido modificada a fin de especificar que el producto se prepara a partir de la planta de tabaco obtenida en la etapa (c);
8. Se ha incluido la nueva reivindicación 14. El soporte para esta modificación se encuentra en las líneas 1 a 13 de la página 15 de la descripción;
9. Se han incluido las nuevas reivindicaciones 15 y 16, las cuales corresponden a las reivindicaciones 18 y 20 de la solicitud internacional;
10. Las reivindicaciones han sido reenumeradas de conformidad con las modificaciones realizadas.

Estas modificaciones se ajustan al 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 MATERIA NO PATENTABLE

El Examinador ha considerado que las antiguas reivindicaciones 1 a 11 no eran materia de patentabilidad de acuerdo con el art. 20 D 486, literal c).

Con respecto a la objeción del Examinador es preciso aclarar que las antiguas reivindicaciones 1 a 11 se han eliminado, en consecuencia, ninguna de las reivindicaciones presentadas, reclaman una planta u otra materia relacionada con excepción de patentabilidad. Así, tomando como punto de partida el capítulo reivindicatorio modificado presentado junto con este memorial se da por superada esta objeción.

III. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

1. El Examinador ha considerado que la antigua reivindicación 12 (nueva reivindicación 1) estaba escrita de manera redundante por mencionar de manera repetida la expresión “*comprende*”. Respecto a lo anterior es preciso mencionar que con el único fin de agilizar el trámite la segunda palabra “*comprende*” fue remplazada por “*incluye*”. Así las cosas, se da por superada esta objeción.

2. El Examinador ha señalado que la antigua reivindicación 12 (nueva reivindicación 1) carecía de claridad por presentar un error tipográfico. Al respecto es preciso mencionar que dicho error ha sido corregido al remplazar la palabra objetada por “*incluye*”. De esta manera se da por superada esta objeción.

3. El Examinador ha sugerido reemplazar la expresión “*un RNA transgénico antisentido*”. A fin de atender la sugerencia del Examinador se ha remplazado dicha expresión por “*un ARN de interferencia transgénico*”. De esta manera se da por superada la objeción a este respecto.

4. Con respecto a la objeción del examinador en contra de la claridad de la antigua reivindicación 13 por usar el término “*preferentemente*”, se desea poner de presente que, tal y como se mencionó en el numeral I del presente memorial, dicha expresión ha sido eliminada y por tanto esta objeción se entiende como superada.

5. El Examinador ha objetado la antigua reivindicación 13 argumentando que la expresión en “*uno o más genes de nicotina N-desmetilasas adicionales*” no era clara ni estaba sustentada en la descripción. Respecto a lo anterior es preciso mencionar que, el fragmento objetado ha sido eliminado de dicha reivindicación y, por tanto, la reivindicación mencionada es clara y está soportada en la descripción. Teniendo en cuenta lo anterior, se da por superada esta objeción.

IV. ESTADO DE LA TÉCNICA

El Examinador determinó tres documentos como relevantes para realizar el análisis de patentabilidad de la presente patente de invención:

1. D1, referido al documento US2014076339 titulado “*Methods of reducing tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) and/or improving leaf quality in tobacco*” que se relaciona

con métodos para evitar la formación de nitrosaminas específicas de tabaco (TSNAs, Tobacco-Specific Nitrosamines) y/o mejorar la calidad de hoja durante el curado de tabaco.

2. D2, referido al documento WO2009064771 titulado "*Alteration of tobacco alkaloid content through modification of specific cytochrome p450 genes*" que se divulga composiciones y métodos para reducir los niveles de nornicotina y sus metabolitos, como NNN (N'-nitrosonornicotina) en plantas del género Nicotiana, a través de la inhibición de la expresión o de la función de una citocromo P450 involucrada en la conversión metabólica de nicotina a nornicotina.

2. D3, referido al documento WO2011088180 titulado "*Compositions and methods for minimizing nornicotine synthesis in tobacco*" que se relaciona con composiciones y métodos para disminuir la síntesis de nornicotina y sus metabolitos en plantas de tabaco, o parte de estas, a través de mutagénesis en uno o más de los genes conocidos para la nicotina N-desmetilasa, permitiendo así producir plantas de tabaco caracterizadas por su baja tasa de conversión de nicotina a nornicotina.

V. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NIVEL INVENTIVO

El Examinador afirma que las reivindicaciones 12 a 14 (nuevas reivindicaciones 1 a 3), actualmente en trámite, no son inventivas en vista de D2 (WO2009/064771) cuando se combina con D3 (WO 2011/088180). Por otra parte, el Examinador considera que las reivindicaciones 15 y 16 (nuevas reivindicaciones 12 y 13) también son obvias en vista de D1 (US 2014076339) cuando se combinan con D3.

Respecto a lo anterior se desea respetuosamente manifestar nuestro desacuerdo. En particular las reivindicaciones presentadas junto con el presente memorial deben ser consideradas nuevas e inventivas teniendo en cuenta el método problema solución que se plantea a continuación:

- D2 se refiere a un método para reducir el nivel de nornicotina y su metabolito, N'-nitrosonornicotina (NNN) en plantas de tabaco al inhibir la expresión o función de la nicotina enzimas desmetilasas CYP82E5v2 y CYP82E4v2. La inhibición se logró mediante la introducción de mutaciones en las proteínas, lo que resulta en una reducción de la conversión metabólica de nicotina a nornicotina en ~ 0.5% en hojas en comparación con el control de baja conversión (TN90 LC) (Tabla 7 de D2). D2 se considera como la técnica

anterior más cercana porque describe la combinación de características que constituyen el punto de partida más prometedor para un desarrollo en la dirección de la invención.

- Por su parte, la nueva reivindicación 1 difiere de D2 porque comprende una célula vegetal que incluye un polinucleótido que tiene una secuencia que codifica una nicotina N-desmetilasa funcional y que tiene una identidad de 96% a 100% con la SEC ID NO: 2 (es decir, la proteína NND3). Además, cabe la pena resaltar que la proteína NND3 es inhibida por el ARN de interferencia, en lugar de mutagénesis, así como se menciona claramente en el paso (b) de la nueva reivindicación 1.

- De igual manera, en la Figura 1 de la presente solicitud se muestra que la proteína NND3 se expresa en flores, cápsulas y raíces, pero no en hojas. Este patrón de expresión de la nicotina N-desmetilasa es muy diferente de otros similares conocidos en la técnica. En particular, como se evidencia en el Ejemplo 3 de la presente solicitud, el silenciamiento de este gen conduce a una reducción significativa de la conversión metabólica de nicotina a norcicotina en flores. En la Acción oficial, el Examinador intentó comparar los resultados de D2 con los de la presente solicitud. Sin embargo, consideramos que los resultados no son comparables en el sentido de que D2 solamente describe la conversión de nicotina en hojas. Dado que NND3 no se expresa en hojas, se espera que la conversión de nicotina en las hojas es casi igual, incluso si la proteína está silenciada.

- Teniendo en cuenta lo anterior, y si se planteara el problema técnico como lo ha sugerido el Examinador: *¿cómo proporcionar un método alternativo ara reducir los niveles de norcotina y/o NNN en plantas de tabaco?*

- A partir de D2, la persona experta habría tenido muchas maneras diferentes de reducir los niveles de norcicotina y / o NNN en plantas de tabaco. Sin embargo, consideramos que ninguno de los documentos citados anteriormente, llevarían a una persona versada en la materia a plantear un método como el reivindicado.

- El examinador argumenta que un experto en la materia habría identificado la proteína NND3 basándose en los métodos enseñados por D3. Al respecto, deseamos respetuosamente manifestar nuestro desacuerdo. Si así fuera el caso, la proteína habría sido descrita en D3; sin embargo, D3 solo enseña una forma general para la identificación de genes. En este sentido, se llama la atención del Examinador sobre el hecho que la identificación de un nuevo gen requiere una gran cantidad de trabajo experimental. Incluso, si la persona experta hubiera identificado un gen similar a la nicotina N-desmetilasa descrito en D3, el gen podría no poseer necesariamente alguna actividad de

conversión de nicotina. Como es bien sabido en la técnica, la función de la familia del citocromo P450 no se puede inferir por la homología, ya que algunos aminoácidos de diferencia son suficiente para cambiar o mitigar la especificidad del sustrato (primer párrafo del Ejemplo 2 de la presente solicitud). Por ejemplo, la Tabla 3 de D2 muestra varios miembros de la familia nicotina N-desmetilasa; Sin embargo, CYP82E5v2 y CYP82E4v2 son las únicas proteínas representadas que tienen actividad nicotina desmetilasa, de acuerdo con **D2**.

- Además, como se discutió anteriormente, la proteína NND3 de la presente solicitud no se expresa en hojas. Esta suele ser una de las principales preocupaciones en el campo, ya que las hojas de tabaco son los ingredientes principales para fabricación de cigarrillos. Como resultado, es común estudiar solo los perfiles de expresión para las proteínas en las hojas (por ejemplo, Tabla 5 de D2). En ausencia del conocimiento de que la proteína NND3 es en realidad abundante en flores y raíces, afirmamos que la persona experta no tendría la motivación para inhibir su expresión o actividad.

- Quisiéramos añadir que, acorde al Artículo 18 de la Decisión 486, una invención tiene nivel inventivo cuando no hubiese resultado obvia ni se hubiera derivado de manera evidente del estado de la técnica para la persona medianamente versada en la materia. El análisis de nivel inventivo no puede entonces basarse en si la invención era -posible de desarrollarse-, pues esto haría de todas las invenciones obvias y, tal y como se evidencia, existe. En otras palabras, lo que debería hacer parte del análisis no es lo que la persona medianamente versada en la materia podría haber hecho en la fecha de prioridad sino lo que habría hecho teniendo en cuenta de sus conocimientos en el área y lo enseñado en el arte previo. Además, no puede basarse el análisis tampoco en si la invención es -mejor- que el arte previo o si presenta efectos mejorados, o si existe un documento que invite al científico a llevar a cabo investigación, sino únicamente en si la invención resulta obvia o evidentemente derivable del arte previo, lo cual, como se explicó anteriormente, no aplica para el presente caso.

- Teniendo en cuenta lo anterior, la nueva reivindicación 1 es inventiva. Para afirmar lo contrario claramente implica un análisis retrospectivo inadmisibles. El mismo argumento se aplica a las nuevas reivindicaciones 2 a 16.

VI. 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.

VII. ANEXOS

1. Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 16 reivindicaciones;

Señor Director,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908