



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

OPOS

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

P.C.T

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

04-32188

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO 1. PLANTA DE CAFE CON ACTIVIDAD DE
-C-D-GALACTOSIDASA REDUCIDA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/82

71. SOLICITANTE SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.

DOMICILIO UGUEY, SUIZA

74. APODERADO JOSE ANTONIO LLOREDA
T.P. 10.784 CÓDIGO. 231

22. BOGOTÁ, D. C., 5 ABRIL 2004.

PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA



34 032188 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 04032188 00000000 Folios: 65
 Fecha (ORD): 2004-04-05 17:25:47
 Trámite : 011 PCT-PAIENI 3/1 FASE NACI 411 PRESENTA
 Dependencia: 2100 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
 PCT
 ENTRADA EN FASE NACIONAL**

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

S LICITANTE
(71)

Nombre: SOCIETE DES PRODUITS
 NESTLE S.A.

Dirección: P.O. Box 353, CH-1800
 Vevey, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5o.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: MARRACCINI, Pierre; DESHAYES, Alain y ROGERS, John

Dirección: Res Vale das Araucarias, Rua Walter Motta Campos No. 233, 86047-670 Londrina, Paraná; 32 rue Calmete, F-37540 Saint Cyr sur Loire y 8, rue Gallée, F-01630 St Genis Pouilly.

Nacionalidad o Domicilio: BRASIL Y FRANCIA.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP02/09148

Fecha: 15-08-2002

Publicación Internacional No. WO 03/032713 A3

Fecha: 24-04-2003

⑥

Título (54) "PLANTA DE CAFE CON ACTIVIDAD DE α -D-GALACTOSIDASA REDUCIDA"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/82

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI



NO



EP

10-10-2001

01124160.1

⑨

Comprobante de Pago No. 04-24,985

Fecha: Marzo 26, 2004

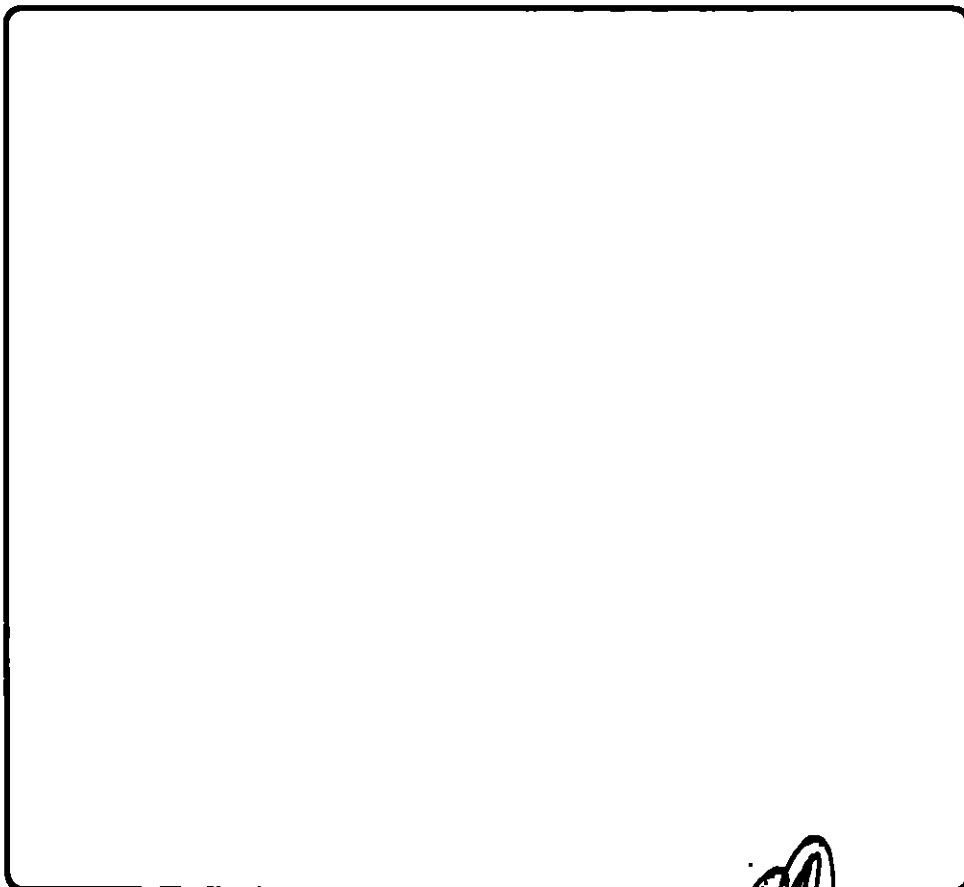
ANEXOS

10

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. Protocolizado bajo el número 11.145.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Capítulo reivindicatorio como fue originalmente presentado en fase internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las reivindicaciones y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO MOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Btá. T.P. 10.784

SEDE ADMINISTRATIVA Y LEGAL
 Radicación : 00002166 0000000000
 Fecha (FMM): 2004-04-05 17:26:19
 Remite : 001 PLI-PAI/MI 3/9 FMS MAR 2004
 Dependencia: 2004 DIVISION W. SERV. LEGALES

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 24,985
 FECHA : MARZO 26 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21917361	26/03/2004	12,609,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

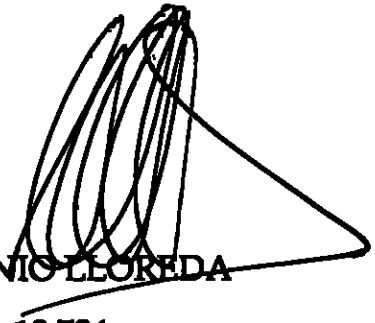
SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 11.145. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

Código 231

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/09148

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C12N15/82

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

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

IPC 7 C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, WPI Datos, PAJ, BUSQUEDA DE SECUENCIA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	ZHU A ET AL: "CLONACION Y EXPRESION FUNCIONAL DE UN CADN QUE CODIFICA ALFA-GALACTOSIDASA EN GRANOS DE CAFÉ" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Vol. 140, no. 2, 1994, páginas 227-231, XP002062116 ISSN: 0378-1119 citado en la solicitud el documento completo — -/-	1,2,6,9

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

28 de Agosto de 2003

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

11/09/2003

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B.5818 Patentalaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Holtorf, S

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Julio 1992)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/09148

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	GOLDEN KERITH D ET AL: "Beta-Galactosidasa de Coffea arabica y su papel en la maduración de la fruta" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 34, no. 2, 1993, páginas 355-360, XP008002908 ISSN: 0031-9422 el documento completo	1,2,6,9
X	WO 95 06478 A (HAWAII BIOTECH GROUP) Marzo 9, 1995 (1995-03-09) ejemplo 3	1,2,6,9
A	EP 1 138 771 A (NESTLE SA) Octubre 4, 2001 (2001-10-04) el documento completo	
A	COCK J M ET AL: "Transcriptores naturales antisentido del gen S locus receptor de cinasa y secuencias relacionadas en Brassica oleracea" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 255, no. 5, 1997, páginas 514-524, XP002252703 ISSN: 0026-8925 el documento completo	
A	MARRACCINI PIERRE ET AL: "Clonación molecular del gen completo 11S de la proteína almacenada en la semilla de Coffea Arabica y análisis del promotor en plantas transgenicas de tabaco" PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY (PARIS), vol. 37, no. 4, Abril 1999 (1999-04) páginas 273-282, XP002197483 ISSN: 0981-9428 citado en la solicitud el documento completo	
A	SACHSLEHNER A ET AL: "Hidrólisis de manano de café aislado y extracto de café mediante mananosas de Sclerotium rolfsii" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM. NL. vol. 80, no. 2, Junio 23, 2000 (2000-06-23), páginas 127-134, XP004213502 ISSN: 0168-1656 página 128, columna a mano izquierda, parágrafo 2	
	-/-	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/09148

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	HAIBACH F ET AL: "PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ISOENZIMA α-D-GALACTOSIDASA DE COFFEA CANEPHORA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO FL, US, vol. 181, no. 3, Diciembre 31, 1991 (1991-12-31), páginas 1564-1571, XP000644469 ISSN: 0006-291X figura 1 —	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/09148

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda			Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación
WO	9506478	A	09-03-1995	US	6329191	B1	11-12-2001
				AU	7640794	A	22-03-1995
				EP	0722336	A1	24-07-1996
				WO	9506478	A1	09-03-1995
EP	1138771	A	04-10-2001	EP	1138771	A1	04-10-2001
				WO	0175084	A2	11-10-2001
				EP	1272642	A2	08-01-2003
				US	2003131380	A1	10-07-2003

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/09148A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU A ET AL: "CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A CDNA ENCODING COFFEE BEAN ALPHA-GALACTOSIDASE" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 140, no. 2, 1994, pages 227-231, XP002062116 ISSN: 0378-1119 cited in the application the whole document -/-	1,2,6,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underline the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2003

Date of mailing of the international search report

11/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 1
NL - 2000 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 051 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-2010

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/09148

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOLDEN KERITH D ET AL: "Beta-Galactosidase from <i>Coffea arabica</i> and its role in fruit ripening." PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 34, no. 2, 1993, pages 355-360, XP008002908 ISSN: 0031-9422 the whole document	1,2,6,9
X	WO 95 06478 A (HAWAII BIOTECH GROUP) 9 March 1995 (1995-03-09) example 3	1,2,6,9
A	EP 1 138 771 A (NESTLE SA) 4 October 2001 (2001-10-04) the whole document	
A	COCK J M ET AL: "Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in <i>Brassica oleracea</i>." MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 255, no. 5, 1997, pages 514-524, XP002252703 ISSN: 0026-8925 the whole document	
A	MARRACCINI PIERRE ET AL: "Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of <i>Coffea arabica</i> and promoter analysis in transgenic tobacco plants." PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY (PARIS), vol. 37, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 273-282, XP002197483 ISSN: 0981-9428 cited in the application the whole document	
A	SACHSLEHNER A ET AL: "Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of <i>Sclerotium rolfsii</i>" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 80, no. 2, 23 June 2000 (2000-06-23), pages 127-134, XP004213502 ISSN: 0168-1656 page 128, left-hand column, paragraph 2	

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09148

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAIBACH F ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A COFFEA CANEPHORA ALPHA-D-GALACTOSIDASE ISOZYME" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 181, no. 3, 31 December 1991 (1991-12-31), pages 1564-1571, XP000644469 ISSN: 0006-291X figure 1	

Form PCT/ISA/210 (Instruction of second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/09148

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506478	A	09-03-1995	US 6329191 B1 11-12-2001
		AU 7640794 A 22-03-1995	
		EP 0722336 A1 24-07-1996	
		WO 9506478 A1 09-03-1995	
EP 1138771	A	04-10-2001	EP 1138771 A1 04-10-2001
		WO 0175084 A2 11-10-2001	
		EP 1272642 A2 08-01-2003	
		US 2003131380 A1 10-07-2003	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2002)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación

Abril 24 de 2003 (24.04.2003)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT

WO 03/032713 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes²: C12N 15/82

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP02/09148

(22) Fecha de Registro Internacional: Agosto 15 de 2002 (15.08.2002)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

01124160.1

Octubre 10 de 2001 (10.10.2001)

EP

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibir modificaciones

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. [CH/CH]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
13 de Noviembre de 2003

(72) Inventores; e

(73) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): MARRACCINI, Pierre [FR/BR]; Res Vale das Araucarias, Rua Walter Motta Campos No. 233, 86047-670 Londrina, Paraná (BR). DESHAYES, Alain [FR/FR]; 32 rue Calmeta, F-37540 Saint Cyr sur Loire (FR). ROGERS, John [GB/FR]; 6, rue Gallée, F-01630 St Genis Pouilly (FR).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(74) Agente: STRAUS, Alexander; Becker, Kurig, Straus, Bavarianstrasse 7, D-80336 München (DE).

(54) Título: "PLANTA DE CAFÉ CON ACTIVIDAD DE α -D-GALACTOSIDASA REDUCIDA"(57) Resumen: La presente invención se relaciona con modificaciones de galactomananos presentes en la semilla del café verde mediante la reducción del nivel endógeno de la actividad de α -D-galactosidasa. En particular la presente invención pertenece a una célula de planta con actividad de α -D-galactosidasa reducida y a una planta que alberga esa célula de planta.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/032713 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/82

(21) International Application Number: PCT/EP02/09148

(22) International Filing Date: 15 August 2002 (15.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01124160.1 10 October 2001 (10.10.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCI-
ETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box
353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MARRACCINI,
Pierre [FR/BR]; Res Vale das Arancarias, Rua Walter
Mota Campos No. 233, 86047-670 Londrina, Paraná
(BR). DESHAYES, Alain [FR/FR]; 32 rue Calmete,
F-37540 Saint Cyr sur Loire (FR). ROGERS, John
[GB/FR]; 6, rue Galilée, F-01630 St Genis Pouilly (FR).

(74) Agent: STRAUS, Alexander; Becker, Kurig, Straus,
Bavariastrasse 7, D-80336 München (DE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
13 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COFFEE PLANT WITH REDUCED α -D-GALACTOSIDASE ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention relates to the modification of galactomannans present in the green coffee bean by reducing the endogenous level of α -D-galactosidase activity. In particular the present invention pertains to a plant cell with reduced α -D-galactosidase activity and to a plant harboring such a plant cell.

WO 03/032713 A3

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL CON SU TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1. Una célula de planta de café, caracterizada porque produce galactomananos, estando la ramificación de galactosa implementada en ella.

5 2. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el nivel endógeno de actividad de la α -D-galactosidasa está reducido.

10 3. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque contiene un ácido nucleico que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo derivada del gen de la α -D-galactosidasa.

15 4. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el ácido nucleico, que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo, derivado del gen de la α -D-galactosidasa está bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.

20 5. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque el promotor es el promotor *cspI* del café.

25 6. Una planta de café, caracterizada porque comprende una célula de planta de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7. Un método para preparar café soluble,

caracterizado porque comprende el paso de usar semillas de café derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 6.

5 8. Un método para incrementar la solubilidad del café, caracterizado porque incluye el paso de usar semillas de café derivadas de una planta de conformidad con la reivindicación 6.

10 9. El uso de semillas derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 6, para la preparación de café soluble.

CLAIMS

1. A coffee plant cell, producing galacto-mannans, the galactose branching therein being increased.
2. The coffee plant cell according to claim 1, wherein the endogenous level of α -D-galactosidase activity is reduced.
3. The coffee plant cell according to claim 1 or 2, containing a nucleic acid that is transcribed to a ribonucleic acid, which is antisense to the mRNA, or a part thereof, derived from the α -D-galactosidase gene.
4. The coffee plant cell according to claim 3, wherein the nucleic acid that is transcribed to a ribonucleic acid, which is antisense to the mRNA, or a part thereof, derived from the α -D-galactosidase gene is under the control of a constitutive or inducible promoter.
5. The plant cell according to claim 5, wherein the promoter is the coffee *csp1* promoter.
6. A coffee plant containing a plant cell according to any of the preceding claims.
7. A method for preparing soluble coffee which comprises the step of using coffee beans derived from a coffee plant according to claim 6.
8. A method for increasing the solubility of coffee, which comprises the step of using coffee beans derived from of a plant according to claim 6).
9. Use beans derived from a coffee plant according to claim 6 for the preparation of soluble coffee.

18

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 80331/WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP02/09148	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 15.08.2002	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10.10.2001
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7 A01H5/00		
Solicitante SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.		

1.	Este reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36.
2.	Este REPORTE consta de un total de 6 páginas, incluyendo la carátula. ☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de 1 páginas.
3.	Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda 22.04.2003	Fecha de terminación de este reporte 05.12.2003
Nombre y dirección de la autoridad internacional de examen preliminar: European Patent Office – P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas Tel. +31 70 340-2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340-3016	Funcionario autorizado Holtorf, S Teléfono No. +31 70 340-2627

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/EP02/09148

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Páginas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas

1-19 como se publicó

Reivindicaciones, Números

1-8 recibida el 21.11.2003 con carta de 21.11.2003

Listado de secuencia parte de la descripción, páginas:

17-19, como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, páginas

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte.)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial;
 citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	St:	Reivindicaciones	
	No:	Reivindicaciones	1-8
Nivel inventivo (IS)	St:	Reivindicaciones	
	No:	Reivindicaciones	1-8
Aplicabilidad industrial (IA)	St:	Reivindicaciones	1-8
	No:	Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones
 Ver hoja separada

Re Item V

Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto de la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: Gene, Elsevier. Biomedical Press. Amsterdam, NL(1994), 140(2), 227-231
- D2: Fitoquímica (Oxford) (1993), 34(2), 355-360
- D3: WO-A-9506478
- D4: EP-A-1138771
- D5: Genética Molecular & General (1997), 255(5), 514-524

Claridad (Art. 6 PCT) y Novedad (Art. 33(2) PCT)

La reivindicación 1-2 y las reivindicaciones que dependen de ella o que se refieren a ella no cumplen los requerimientos del Art. 6 PCT en cuanto a que el asunto para el cual se busca protección no se ha definido claramente.

La redacción de dichas reivindicaciones no se limita a células de plantas de café transgénicas caracterizadas por la transformación con una construcción transgene específica pero de hecho también comprenden células de plantas de café no transformadas, tipo silvestre.

Las células de plantas de café no transformadas –en especial las células de semillas de café – muestran un nivel reducido de la "actividad alfa-D-galactosidasa" y por lo tanto muestran también "una ramificación galactosidasa aumentada" en ciertas etapas durante el desarrollo y la maduración.

Además, la materia objeto de la reivindicación 1 como se ha delineado actualmente además de referirse a células de plantas modificadas transgénicamente también se refiere a células de plantas de café que se originan de métodos de producción de plantas que generalmente aplican que comprenden esencialmente procesos biológicos y por lo tanto la redacción de la reivindicación 1 extiende el alcance de protección de una manera vaga y no definida precisamente.

Además, la reivindicación 2 no se limita a moléculas de mRNA antisentido generadas al

transformar una planta con construcción antisentido pero de hecho también comprendería posibles "transcripciones antisentido naturales" que se originan en células de plantas no transformadas (ver documento D5).

Debido a la falta de claridad de dichas reivindicaciones y debido al hecho de que las plantas de café de tipo silvestre que comprenden células de plantas de café no transformadas ya existen y muestran las características de las reivindicaciones 1-2 y de las reivindicaciones que dependen de ellas o que se refieren a ellas, se considera que los documentos D1-D3 destruyen la novedad (Art. 33(2) PCT) para dichas reivindicaciones.

Nivel Inventivo (Art. 33(3) PCT)

EP 1138771 (D4), que es la técnica anterior más cercana revela un método para prevenir la formación de sedimentos formados por mananos insolubles durante la preparación del café expresando construcciones de sentido de la endo-beta-mananasa específica del café.

La diferencia entre D4 y la solicitud actual yace en la selección de la alfa-D-galactosidasa como un objetivo alternativo para influir positivamente la solubilidad de los galactomananos durante la preparación del café.

El problema que hay que resolver podría por lo tanto ser formulado como la provisión de un método para prevenir que los galactomananos del café se volviera insoluble por la liberación de unidades de galactosidasa alfa-1,6-unidas de los galactomananos.

La solución reivindicada en la presente aplicación es el uso de construcciones antisentido de alfa-D-galactosidasa del café para la reducción de su actividad en plantas de café transgénicas.

Aunque la existencia de alfa-D-galactosidasa del café ya es conocida en la técnica anterior, ningún documento podría ser identificado que revele o sugiera la generación de construcciones antisentido de alfa-D-galactosidasa para reducir la liberación de unidades de galactosidasa alfa-1,6-unidas de los galactomananos en semillas de café.

En concordancia, el uso de construcciones antisentido alfa-D-galactosidasa en plantas de café transgénicas podría ser considerado como inventivo siempre y cuando dichas construcciones tengan el efecto pretendido sobre la solubilidad durante la preparación de café. Sin embargo, de la descripción no puede concluirse que el problema se haya de hecho solucionado. En ausencia de datos experimentales no es posible en el momento hacer una declaración final sobre inventividad respecto del Art. 33 (3) PCT.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de planta de café, que produce galactomananos, célula la cual se caracteriza por haber sido modificada de modo que el nivel endógeno de actividad de α -galactosidasa se reduzca de modo que se incremente la ramificación de la galactosa de los galactomananos.
2. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque contiene un ácido nucleico que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo derivada del gen de la α -D-galactosidasa.
3. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el ácido nucleico que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo, derivado del gen de la α -D-galactosidasa está bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.
4. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el promotor es el promotor *cspI* del café.
5. Una planta de café, caracterizada porque comprende una célula de planta de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. Un método para preparar café soluble, caracterizado porque comprende el paso de usar semillas de café derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 5.
7. Un método para incrementar la solubilidad del café, caracterizado porque incluye el paso de usar semillas de café derivadas de una planta de conformidad con la reivindicación 5.
8. El uso de semillas derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 5, para la preparación de café soluble.

HOJA ENMENDADA

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 80331/WO		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEAA16)	
International application No. PCT/EP02/09148	International filing date (day/month/year) 15.08.2002	Priority date (day/month/year) 10.10.2001	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A01H5/00			
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.			
1. This International preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 1 sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Rule 86.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 22.04.2003		Date of completion of this report 05.12.2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3018		Authorized Officer Holtorf, S Telephone No. +31 70 340-2827 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP02/09148

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, Pages

1-19 as published

Claims, Numbers

1-8 received on 21.11.2003 with letter of 21.11.2003

Sequence listing part of the description, pages:

17-19, as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-8
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-8
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-8
	No: Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement.

Reference is made to the following documents :

- D1: Gene, Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, NL (1994), 140(2), 227-231**
- D2: Phytochemistry (oxford) (1993), 34(2), 355-360**
- D3: WO-A-9506478**
- D4: EP-A-1138771**
- D5: Molecular & General Genetics (1997), 255(5), 514-524**

Clarity (Art. 6 PCT) and Novelty (Art. 33 (2) PCT)

Claim 1-2 and claims depending thereon or referring thereto do not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The wording of said claims is not limited to transgenic coffee plant cells characterized by the transformation with a specific transgene-construct but indeed also encompasses wild type, untransformed coffee plant cells.

Untransformed coffee plant cells - especially coffee bean cells - do exhibit a "reduced level of alpha-D-galactose activity" and therefore also exhibit "an increased galactose branching" in certain stages during development and maturation.

Furthermore, the subject matter of claim 1 as currently drafted apart from referring to transgenically modified plant cells also refers to coffee plant cells originating from generally applicable plant breeding methods involving essentially biological processes and thereby the wording of claim 1 extends the scope of protection in a vague and not precisely defined way.

Furthermore, claim 2 is not limited to antisense mRNA molecules that are generated by

transforming a plant with an antisense construct but indeed would also enclose possible "natural antisense transcripts" originating in non-transformed plant cells (see document D5).

Due to the lack of clarity of said claims and due to the fact that wild type coffee plants comprising untransformed coffee plant cells do already exist and exhibit the characteristics of claims 1-2 and of claims depending thereon or referring thereto, documents D1-D3 are considered of being novelty-destroying (Art. 33 (2) PCT) for such claims.

Inventive Step (Art. 33 (3) PCT)

EP1138771 (D4), which is the closest prior art discloses a method of preventing the formation of sediments formed by insoluble mannans during coffee preparation by expressing sense constructs of the coffee-specific endo-beta-mannanase.

The difference between D4 and the current application lies in the selection of the alpha-D-galactosidase as an alternative target to positively influence the solubility of the galactomannans during coffee preparation.

The problem to be solved could therefore be formulated as the provision of a method to prevent coffee galactomannans from becoming insoluble by the release of alpha-1,6-linked galactose units from galactomannans.

The solution claimed in the present application is the use of antisense constructs of the coffee alpha-D-galactosidase for the reduction of its activity in transgenic coffee plants.

Although the existence of the coffee alpha-D-galactosidase is already known in the prior art, no document could be identified that discloses or would suggest the generation of alpha-D-galactosidase antisense constructs to reduce the release of alpha-1,6-linked galactose units from galactomannans in coffee beans.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP02/09148

Accordingly, the use of the alpha-D-galactosidase antisense constructs in transgenic coffee plants could be regarded as being inventive providing that said constructs would have the intended effect on solubility during coffee preparation. However, from the specification it can not be concluded that the problem has in fact been solved. In the absence of experimental data it is at present not possible to make a final statement on inventivity with respect to Art. 33 (3) PCT.

CLAIMS

1. A coffee plant cell, producing galacto-mannans, which cell has been modified such that the endogeneous level of α -galactosidase activity is reduced, so that the galactose branching of the galactomannans being increased.
- ~~2. [The coffee plant cell according to claim 1, wherein the endogeneous level of α -D-galactosidase activity is reduced]~~
2. The coffee plant cell according to claim 1 ~~or 2~~, containing a nucleic acid that is transcribed to a ribonucleic acid, which is antisense to the mRNA, or a part thereof, derived from the α -D-galactosidase gene.
3. The coffee plant cell according to claim ~~2~~², wherein the nucleic acid that is transcribed to a ribonucleic acid, which is antisense to the mRNA, or a part thereof, derived from the α -D-galactosidase gene is under the control of a constitutive or inducible promoter.
4. The plant cell according to claim ~~3~~³, wherein the promoter is the coffee *cap1* promoter.
5. A coffee plant containing a plant cell according to any of the preceding claims.
6. A method for preparing soluble coffee which comprises the step of using coffee beans derived from a coffee plant according to claim ~~6~~⁵.
7. A method for increasing the solubility of coffee, which comprises the step of using coffee beans derived from of a plant according to claim ~~6~~⁵.
8. Use beans derived from a coffee plant according to claim ~~6~~⁵ for the preparation of soluble coffee.

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

PLANTA DE CAFE CON ACTIVIDAD DE α -D-GALACTOSIDASA REDUCIDA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con
modificaciones de galactomananos presentes en la semilla
del café verde mediante la reducción del nivel endógeno de
la actividad de α -D-galactosidasa. En particular la
presente invención pertenece a una célula de planta con
10 actividad de α -D-galactosidasa reducida y a una planta que
alberga esa célula de planta.

15

20

25

PLANTA DE CAFE CON ACTIVIDAD DE α -D-GALACTOSIDASA REDUCIDA

La presente invención se relaciona con la modificación de galactomananos presentes en la semilla de café verde, mediante la reducción del nivel endógeno de la actividad de la α -D-galactosidasa. En particular, la presente invención pertenece a una célula de planta con la actividad de α -D-galactosidasa reducida y con una planta que contiene esa célula de planta.

En granos de café, los polisacáridos de la pared celular contribuyen a aproximadamente el 48% en peso de las semilla de café madura, del cual los mananos representan aproximadamente la mitad. Esos polisacáridos son esencialmente insolubles en forma pura y tienen una ramificación de galactosa muy baja (Bradbury and Haliday, J. agric. Food Chem 38 (1990), 389-392). Se reconoce que los polímeros de manano son la razón principal de las grandes pérdidas de peso de café verde original encontradas durante la preparación de bebidas de café soluble. Las pérdidas ocurren cuando el material insoluble permanece como sedimento durante la extracción inicial o cuando precipita y forma geles durante el almacenamiento de licores de café. Los mananos también han demostrado ser el componente principal responsable de la turbidez y precipitación durante el reposo de las bebidas de café.

En algunas plantas se ha encontrado que el grado

de ramificación de la galactosa sobre las cadenas de manano depende parcialmente de la actividad de la α -D-galactosidasa (EC 3.2.1.22). Esta enzima es capaz de liberar las unidades de galactosa ligadas en las posiciones α -1,6 de los galactomananos almacenados en el tejido de almacenamiento de la semilla de planta o maduración (Buckeridge and Dietrich, Plant Sci. 117 (1996), 33-43). Además, también la acumulación de galactomananos que tienen una relación de galactosa/manosa muy baja en algunos tejidos de endospermas o cotiledones de plantas ha mostrado estar correlacionada con un pico de actividad de α -D-galactosidasa durante la maduración de esos tejidos y con un endurecimiento y deshidratación de los mismos (Kontos and Spyropoulos, Plant Physiol. Biochem 34 (1996) 787-793).

La actividad de la α -D-galactosidasa también ha sido asociada con la capacidad de remover residuos de galactosa, que están ligados en la posición α -1,6 a los polisacáridos de galactomanano, lo cual lleva a una disminución de la solubilidad de los polímeros (McCleary, Carb. Res. 92 (1981), 269-285). Además, la remoción de las cadenas laterales de galactosa de los galactomananos parece incrementar la capacidad de los mismos para interactuar con otros polisacáridos, por ejemplo xantanos en guar, con una formación concomitante de gel complejo. La ramificación de la galactosa en los mananos del grano del café disminuye en aproximadamente 40% en granos jóvenes hasta el bajo nivel

encontrado en los granos maduros durante la maduración. Concurrentemente, la actividad de la enzima α -D-galactosidasa se incrementa durante la maduración del grano de café.

5 El ADNc de la α -D-galactosidasa del café ha sido clonado (Zhu and Goldstein, Gene 140 (1994), 227-231). De acuerdo a la información derivada de lo mismo se presume que la α -D-galactosidasa del grano de café maduro está
10 compuesta de 363 aminoácidos y es sintetizada como una preproenzima de 420 residuos. Después de la biosíntesis, dos escisiones con proteasa remueven una señal de secreción (38 residuos) y otro péptido señal (19 residuos) para producida la proteína que exhibe la secuencia de aminoácidos N-terminal característica de la enzima activa.

15 En vista de los efectos conocidos de los galactomananos sobre la preparación y/o capacidad de almacenamiento del café soluble existía la necesidad en la técnica de mejorar esta situación.

En consecuencia, un objetivo de la presente
20 invención es proporcionar un método mejorado para preparar café soluble, obviando, de manera concurrente, a la vez, las desventajas conocidas cuando se almacenan licores de café.

El problema anterior ha sido resuelto
25 proporcionando una célula de planta de café, y una planta de café, respectivamente, donde la ramificación de la

galactosa en los galactomananos está incrementada.

De acuerdo a una modalidad preferida este objetivo puede ser logrado reduciendo el nivel endógeno de actividad de α -D-galactosidasa. Esto puede ser logrado por métodos convencionales de mutación y selección usando los métodos disponibles en la técnica. De este modo, las células de planta pueden ser sometidas a tratamientos mutagénicos, como la exposición de las mismas a agentes químicos o radiación que lleven a cabo una alteración del ADN de la célula. Las células así tratadas son posteriormente seleccionadas por las propiedades deseadas.

De acuerdo a otra modalidad preferida ese nivel endógeno reducido de actividad de α -D-galactosidasa se obtiene usando un constructo en una célula de planta de café, que contenga un ácido nucleico que sea transcrito en una copia antisentido del ARNm codificado por el gen de la α -D-galactosidasa, o a una parte del mismo.

Hasta este punto, la copia antisentido del ARNm codificado por el gen de la α -D-galactosidasa puede ser cualquier ácido ribonucleico capaz de formar dímeros bajo condiciones fisiológicas, es decir de hibridarse con el ARNm codificado por el gen de la α -D-galactosidasa bajo las condiciones prevalecientes en la célula. De este modo, la copia antisentido no necesita ser 100% homóloga a la contraparte correspondiente, sino que necesita proporcionar suficiente unión para formar un dímero. En consecuencia,

las copias antisentido (y los ácidos nucleicos correspondientes de los cuales se transcribieron), que sean modificadas por sustitución, supresión y/o inserción de nucleótidos también están dentro del contexto de la presente invención. A este respecto, también se apreciará que la copia antisentido puede representar una contraparte completa al ARNm codificado por el gen de la α -D-galactosidasa, es decir, que puede proporcionar una molécula de ARN que tenga esencialmente la misma longitud que el ARNm que codifique para el polipéptido de la α -D-galactosidasa. Por otro lado, la copia antisentido puede cubrir únicamente una parte del ARNm que codifica para el polipéptido de la α -D-galactosidasa.

El ácido nucleico que codifica para un ácido ribonucleico, antisentido al ARNm codificado por el gen de la α -D-galactosidasa, o para una parte del mismo, puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o inducible, de modo que el nivel de ARNm antisentido pueda ser controlada de manera conveniente. Sin embargo, en todos los casos el nivel de la copia antisentido deberá ser suficientemente alto para reducir el número de copias de ARNm que codifique para el polipéptido de la α -D-galactosidasa accesible desde los ribosomas.

De acuerdo a una modalidad preferida el promotor utilizado es el promotor *csp1* del café, el cual da una velocidad de transcripción suficientemente alta.

La presente invención, por lo tanto, proporciona una célula de planta de café y una planta de café modificadas, respectivamente, donde el nivel de actividad de la α -D-galactosidasa ha sido reducido de modo que eventualmente la ramificación de la galactosa sobre los galactomananos se incremente. De acuerdo a una modalidad preferida la planta es una planta transgénica, las células de la cual contienen un constructo capaz de proporcionar una copia antisentido del ARNm derivado del gen de la α -D-galactosidasa o una parte del mismo.

La presente invención también proporciona un método para preparar café soluble, el cual comprende el paso de usar semillas de café derivadas de una planta que exhiba una actividad de α -D-galactosidasa reducida. A este respecto la presente invención también proporciona un método para incrementar la solubilidad del café incrementando la ramificación de la galactosa.

Esta invención tienen como propósito principal incrementar la solubilidad de los galactomananos del café incrementando su ramificación de la galactosa. La estrategia adoptada es reducir el nivel endógeno de actividad de la α -D-galactosidasa, preferiblemente mediante la introducción de una copia antisentido de su ADNc bajo el control del promotor *csp1* del café.

Este promotor *csp1* ya ha sido caracterizado (Marraccini et al., Plant Physiol. Biochem. 37 (1999) 273-

282) y controla la expresión de un gen que codifica para la proteína de almacenamiento 11S del café. Un casete que contiene el promotor fue construido e introducido en la región del T-ADN de un vector primario de transformación, el cual se deriva del plásmido pTiT37 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721). Este vector recombinante fue introducido en *Agrobacterium tumefaciens*, el cual fue usado para transformar plantas de café. Las plantas de café que tienen el T-ADN insertado en su genoma fueron regeneradas y analizadas para determinar la actividad de α -D-galactosidasa en sus granos.

I. Análisis de la actividad de la α -D-galactosidasa en granos de café durante la maduración

Se cosecharon frutos en diferentes etapas de maduración (la edad se expresó como semanas después de la floración: WAF) de *Coffe arabica* variedad Caturra T2308 crecida en invernadero (temperatura de aproximadamente 25°C, humedad del 70% e iluminación natural). Las cerezas fueron congeladas en nitrógeno líquido después de la cosecha y almacenadas a -85°C hasta su uso. Para estudios de maduración, se separaron el endosperma y el perisperma.

El material de planta fue triturado en nitrógeno líquido y extraído en amortiguador de extracción enzimática frío (glicerol al 10% v/v, metabisulfito de sodio 10 mM, EDTA 5 mM, MOPS (NaOH) 40 mM, pH 6.5) a una relación

aproximada de 20 mg por 100 μ l. La mezcla fue agitada sobre el hielo durante 20 min, sometida a centrifugación (12,000 g x 30 min), dividida en alícuotas y almacenada a -85°C hasta su uso. La actividad de la α -D-galactosidasa fue detectada espectrofotométricamente con el sustrato p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (pNGP).

La mezcla de reacción que contenía 200 μ l de pNGP 100 mM en amortiguador de McIlvain (ácido cítrico 100 mM - Na_2HPO_4 200 mM, pH 6.5) se han formado hasta un volumen final de 1 ml con extracto de enzima. La reacción fue mantenida a 26°C y comenzó con la adición de enzima y se detuvo mediante la adición de 4 volúmenes de solución interruptora (Na_2CO_3 - NaHCO_3 100 mM, pH 10.2). La absorción se leyó a 405 nm. El desprendimiento de nitrofenilo se calculó usando el coeficiente de extensión molar $\epsilon = 18300$ (específico para un pH de 10.2) y se convirtió a $\text{mmol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$. La proteína total fue medida de muestras extraídas en amortiguadores acuosos por el método de Bradford (Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254). Para la expresión de la actividad, cada muestra fue extraída y dividida en alícuotas, y se efectuaron ensayos por triplicado, siendo los resultados expresados como promedios.

La actividad y la α -D-galactosidasa es extremadamente baja o indetectable en las etapas del grano joven, y alcanza un pico que coincide con la producción de

color del pericarpio. En las etapas cuales la actividad de clima mientras las cerezas están aún rojas. También se compararon las actividades en diferentes tejidos de la planta de café. La actividad en el perisperma, raíces y
5 hojas es particularmente baja, y cercana a los límites de detección. Sin embargo, se registraron actividades altas en el endosperma donde la actividad alcanza un pico a aproximadamente 36 WAF pero también en granos en germinación después de sumergir en agua.

10

II. Aislamiento del ADNc de longitud completa de la α -galactosidasa de *C. arabica*

Aunque están disponibles varias secuencias de ADNc de α -D-galactosidasa del café en la literatura el
15 origen del material de café no es indicado. Para ver si se observan diferencias en las secuencias de aminoácidos y nucleicas entre *C. arabica* y *C. canephora*, se decidió clonar ADNc de α -D-galactosidasa de ambas especies.

Se construyó una biblioteca de ADNc de *Coffea arabica* var. Caturra T2308 con ARNm poliA+ extraído a las
20 30 semanas después de la floración de acuerdo a Rogers et al. (Plant Physiol. Biochem., 37 (1999), 261-272). Esta biblioteca de ADNc plasmídico (10 ng) fue probada por PCR usando los cebadores BETA1 (SEQ ID NO: 2) y BETA3 (SEQ ID
25 NO: 3) deducidos directamente de la secuencia de ADNc de la α -D-galactosidasa del café (Zhu and Goldstein, 1994). El

cebador BETA1 se localiza entre los nucleótidos 177 y 193 en la secuencia SEQ ID NO: 1. El cebador BETA3 se localiza entre los nucleótidos 1297 y 1313 en la secuencia SEQ ID NO: 1. La reacción de PCR fue efectuada con ADN polimerasa Pfu (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, EUA) en amortiguador 1X apropiado, 0.2 mM de cada dNTP y 0.25 μ M de cada oligonucleótido. Las temperaturas de desnaturalización, recocido y extensión son 94°C durante 30 s, 46°C durante 30 s y 72°C durante 3 min, respectivamente. Este ciclo fue repetido 30 veces en el Robocycler Statagene (EUA). Los productos de la PCR fueron purificados con el cartucho Microcon 100 (Millipore SA, BP307 Saint Quentin Yvelines cedex 78054, Francia) y ligados en el pCR-Script SK (+) de acuerdo a lo descrito por Stratagene (EUA). Entonces se usó mezcla de ligación para transformar la cepa de *E.coli* XL1-Blue MRF' y se purificó un vector recombinante que contiene el fragmento de α -D-galactosidasa y se clonó en el sitio *SfrI* de pCR-Script SK Amp (+). Su secuencia se localiza entre las posiciones 177 y 1313 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

De acuerdo a la literatura, el extremo 5' del ADNc de la α -D-galactosidasa contiene 198 pb corriente arriba del extremo 5' del cebador BETA1. Para clonar esta secuencia de nuestro genotipo, efectuamos una PCR adicional, como se describió anteriormente, con los cebadores BETA100 (SEQ ID NO: 3) y BETA101 (SEQ ID NO: 4).

Esta secuencia de *C. arabica* fue clonada en el vector pCR Script Amp SK (+) para dar el pLP1, y corresponde a la SEQ ID NO: 1.

El ADNc obtenido contiene un marco de lectura
abierto de 1263 pb, que comienza en la posición 51 y que
finaliza en la posición 1313 de la secuencia SEQ ID NO: 1.
El producto de la traducción corresponde a la secuencia SEQ
ID NO: 2 sugiriendo que la α -D-galactosidasa del café es
sintetizada como una preproenzima, usando un codón de
inicio de la traducción ATG en la posición 51 en lugar del
ATG en la posición 126. Por otro lado, el análisis del ADNc
de la α -D-galactosidasa clonado de *C. canephora* mostró que
su producto de traducción es muy homólogo (similitud > 99%)
a la proteína encontrada en *C. arabica*.

15

III. Expresión del gen de la α -D-galactosidasa durante la maduración del grano

Se verificó la expresión del gen que codifica para la α -galactosidasa en un grano de café de *C. arabica*
Caturra cosechados en varias etapas de desarrollo, es
decir, 9, 12, 16, 30 y 35 semanas después de la floración
(WAF). Para hacer esto, se desnaturalizaron 10 μ g de los
ARN totales de esos granos de café durante 15 minutos a
65°C en amortiguador 1 x MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio
5 mM, EDTA 1mM, pH 7) en presencia de formamida (50%) y
formaldehído (0.66 M final). Ellos fueron entonces

25

separados por electroforesis durante 6 horas a 2.5 V/cm, en presencia de amortiguador 1xMOPS, sobre un gel de agarosa al 1.2% que contenía formaldehído 2.2 M como concentración final.

5 Después de la migración, los ARN fueron teñidos con bromuro de etilo (BET) de acuerdo a Sambrook et al., (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA, 1989, capítulo 9.31 a 9.51). Esto hace posible estandarizar las cantidades depositadas sobre
10 un gel desde las intensidades de fluorescencia de los ARN ribosomales de 18S y 25S. Los ARN totales fueron entonces transferidos y fijados sobre una membrana de nylon cargada positivamente de acuerdo a las recomendaciones proporcionadas por Boehringer Mannheim (Roche-Boehringer
15 Mannheim GmbH, Biochemica, Postfach 310120, Mannheim 31, DE). La prehibridación e hibridación se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente.

Los resultados mostraron un pico de expresión del gen durante la primera fase de desarrollo del endosperma.
20 Este pico de expresión de ARNm específica bajo condiciones de invernadero ocurrió a aproximadamente 26 WAF, y corresponde al inicio del incremento de la actividad de la enzima. El periodo pico de expresión del ARNm corresponde al periodo mayor de expansión del endosperma y
25 endurecimiento que toma lugar en los granos maduros bajo esas condiciones. La expresión pico para el ARNm específico

de la α -galactosidasa coincidió o fue ligeramente posterior a la expresión pico del ARNm de la proteína de almacenamiento del grano 11S. Esos resultados condujeron a la construcción de un cassette antisentido de ADNc de café que codifica para la α -galactosidasa, bajo el control del promotor del café 11S, para reducir el nivel de actividad de la α -galactosidasa en granos de café bajo maduración.

10 IV. Construcción del casete antisentido de α -galactosidasa

La secuencia promotora 11S (Marraccini et al., Plant Physiol. Biochem. 37 (1999), 273-282) del café se amplificó con los cebadores específicos UP210-1 correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 7, y BAGUS2, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 8. El oligonucleótido UP210-1 corresponde a la secuencia entre los nucleótidos 24 y 76 publicada por Marraccini et al., *supra* y contiene dentro de su extremo 5' la secuencia sintética CGGGGTACCCCG que contiene un sitio de restricción de *KpnI* y que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 9. El cebador BAGUS2 contiene en su extremo 5' la secuencia sintética CGCGGATCCGCG que corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 10 la cual contiene un sitio de restricción de *BamHI*. Este cebador también contiene los nucleótidos 998 a 976 de la secuencia publicada por Marraccini et al. (1999). Esta reacción se llevó a cabo en presencia de ADN

polimerasa Pfu (3 unidades), con 10 ng de pCSPP4 (WO 99/02688), en un volumen final de 50 µl que contenía KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, Triton X-100 al 0.1%, MgCl₂ 2 mM, BSA a 10 µg/ml, 0.2 mM de cada dNTP, 0.25 µM de cada oligonucleótido descrito anteriormente. La mezcla de reacción fue entonces incubada durante 30 ciclos (94°C-60 s, 55°C-60 s, 72°C-3 min) seguidos por un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min.

El fragmento de la PCR de aproximadamente 950 pb fue purificado sobre un cartucho Microcon 100 (Millipore Francia), y ligado en el vector pCR-Script Amp SK (+) en presencia de ADN ligasa T4 (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, Wisconsin 53711 EUA), de acuerdo a las recomendaciones proporcionadas por el distribuidor. A continuación, la cepa de E.coli XL1-Blue MRF' fue transformada con toda la mezcla de ligación. Se seleccionó una transformación y su plásmido fue purificado para secuenciar el inserto para determinar la orientación del fragmento de la PCR. Este análisis hizo posible de este modo seleccionar el plásmido pLP7.

También se amplificó una versión más corta del promotor 11S por el mismo método excepto que el cebador UP213-1, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 11 reemplaza al cebador UP210-1. Este cebador corresponde a la secuencia entre los nucleótidos 754 y 777 publicada por Marraccini et al., *supra*, y contiene en su extremo 5' la

secuencia sintética SEQ ID NO: 9. Esto condujo a la amplificación de un fragmento de 250 pb del promotor del café p11S el cual fue clonado como se describió anteriormente para dar el plásmido pLP8.

5 Se amplificó el terminador TNOS siguiendo el protocolo descrito para la amplificación del promotor p11S excepto que fueron usados los cebadores TNOS1 que tienen la secuencia nucleica SEQ ID NO: 12 y TNOS2, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 13. El TNOS1 contiene la
10 secuencia SEQ ID NO: 10 en su extremo 5'. El TNO2 contiene la secuencia SEQ ID NO: 9 en su secuencia en el extremo 5'. Esos cebadores condujeron a la amplificación de la secuencia de TNOS del vector comercial p35SGFP (Clontech Laboratories Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto,
15 California 94303-4230 EUA). El producto de la PCR fue clonado en el vector pCR-Script Amp SK (+) como se describió anteriormente, conduciendo al vector recombinante llamado pLP32 y fue secuenciado para determinar su orientación. Este vector fue entonces digerido por *Bam*HI
20 para remover la secuencia de TNOS que fue tratada posteriormente por la ADN polimerasa T4 para proporcionar extremos cortados.

 Por otro lado, los vectores pLP7 y pLP8 fueron linealizados por *Eco*RI y también tratados con ADN
25 polimerasa T4 para proporcionar extremos cortados. El terminador TNOS fue entonces clonado en la orientación

correcta en los vectores pLP7 pLP8 conduciendo a los vectores p11STNOS7 y p11STNOS7+, respectivamente.

El ADNc de la α -galactosidasa fue amplificado del vector pLP1 previamente aislado, usando las condiciones
5 descritas anteriormente excepto que se usaron los cebadores BETA100B1, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 14 y BETA101B1, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 1. Esos oligonucleótidos corresponden a los cebadores BETA101 y BETA100 usados anteriormente en los cuales un sitio de
10 restricción de BamHI correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 10, ha sido introducido en sus extremos 5'. El producto de la PCR fue clonado en el vector pCR-Script Amp SK (+) como se describió anteriormente, conduciendo al vector recombinante llamado pLP20.

15 Este plásmido fue digerido con BamHI para liberar el ADNc de la α -galactosidasa. Por otro lado, los vectores receptores p11STNOS7 y p11STNOS7+ fueron digeridos independientemente por medio de la misma enzima de restricción y desfosforilados por un tratamiento con CIAP
20 de acuerdo al distribuidor (Promega, EUA). El ADNc de la α -galactosidasa fue clonado en la orientación antisentido, respectivamente en los vectores p11STNOS7 y p11STNOS7+, conduciendo a los vectores designados como pALPHA1 y pALPHA9.

25 Para movilizar esos casetes al vector binario usado durante la transformación de la suspensión de células

de café, se llevó a cabo una reacción de PCR final con la ADN polimerasa *Pfu* usando los cebadores UPSAL1, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 16 y UPSAL2, que tiene la secuencia nucleica SEQ ID NO: 17. Ambos oligonucleótidos
5 contienen un sitio de restricción de *SalI* y reconocen secuencias de ADN del vector pCR Script Amp SK (+) que flanquea a las regiones del ADN del promotor 11S y el terminador NOS (TNOS). Además este sitio de restricción está ausente en la secuencia que se intentó introducir en
10 el T-ADN de plásmido binario. Esos productos de la PCR fueron clonados nuevamente en el vector pCR-Script Amp (SK) (+), el cual fue digerido con *SalI* para verificar que este sitio de restricción flanquea los casetes. Los plásmidos obtenidos fueron llamados pALP414, y pALP50, y derivados
15 respectivamente de pALPHA1 y pALPHA9.

V. Clonación del casete antisentido de α -galactosidasa en el vector primario de la transformación

Los casetes de α -galactosidasa contenidos en los
20 vectores pALP414 y pALP50 fueron secuenciados para verificar su integridad, particularmente para verificar que no señalan mutaciones o han ocurrido rearrreglos durante los ciclos de amplificación por PCR. Esos casetes fueron entonces purificados mediante la digestión de los vectores
25 pALP414 y pALP50 con la enzima de restricción *SalI* y clonados independientemente en el plásmido derivado de

pBin19 relacionado con el vector descrito por Leroy et al., (Plant Cell Rep. 19 (1999), 382-389), excepto que el gen *cryIAC* estuvo ausente. Para hacer esto, el vector fue digerido con la enzima de restricción I, el cual reconoce un sitio único entre los genes *uidA* y *csrI-1*, y fue desfosforilado. Después de esta ligación, fueron seleccionados los vectores pBIA121, pBIA126 y pBIA9. En el vector pBIA121, el cassette de *SalI* obtenido del pALP414 es clonado en la orientación [LB]Gus-intron> ADNc de α -galactosidasa antisentido (largo) de p11S > *csrI-1* [RB]. Sin embargo, el mismo casete es clonado en orientación inversa en el vector pBIA126. Por otro lado, el casete de *SalI* obtenido de pAL50 clonado en el vector pBIA9 está en la siguiente orientación [LB]Gus-intron> ADNc de α -galactosidasa antisentido (largo) de p11S > *csrI-1* [RB].

VI. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Los vectores primarios de transformación pBIA121, pBIA126 y pBIA9 descritos anteriormente fueron introducidos independientemente en *Agrobacterium tumefaciens* desarmada cepa LBA4404 de acuerdo al método de transformación directa descrito por An et al., (Plant Mol. Biol. Manuel, Gelvin, Schilperoort y Verma Eds, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Holanda, A3 (1993), 1-19). Para cada transformación, se seleccionaron clones de *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes sobre medio LB suplementado con

canamicina (50 µg/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml).

Para verificar la estatura de los plásmidos introducidos en *Agrobacterium tumefaciens*, ellos fueron extraídos por la técnica de minipreparación rápida y entonces fueron analizados mediante el trazo del mapa de restricción después de la transformación invernical en *E.coli* cepa XL2 Blue MRF'.

VII. Transformación de *Coffea* sp.

Se cultivaron y subcultivaron explantes de hoja cada 5 semanas durante 3 a 5 meses hasta que aparecieron embriones somáticos en el borde de los explantes. Los embriones somáticos fueron cosechados en la etapa torpedo, heridos con un escalpelo estéril y remojados durante 2 horas en solución de NaCl al 0.9% que contenía *Agrobacterium tumefaciens* recombinante cepa LBA4404 a una DO_{600nm} de 0.3 a 0.5. Se efectuó un cocultivo en la oscuridad sobre medio MS semisólido sin hormonas durante 3 días y a continuación se lavo en medio MS líquido que contenía cefotaxima (1 gr/l) durante 3 a 5 horas bajo agitación constante pero suave. Los embriones fueron cultivados sobre medio semisólido con 5 µM de BAP, 90 µM de cefotaxima (400 mg/l) bajo condiciones de baja luz (fotoperiodo de 16 horas por día). Después de un periodo de 3 a 4 semanas, fueron transferidos a un medio MS selectivo suplementado con cefotaxima (400 mg/l) y clorsulfuron (80 mg/l). Ellos

fueron entonces transferidos cada mes a un medio selectivo nuevo hasta la regeneración de callos. Los embriones transformados que crecieron alrededor de los callos fueron entonces cultivados sobre el mismo medio MS semisólido con 5 vitaminas de Morel (BAP 1 μ m y sucrosa 30 μ m) para inducir su germinación. Después de este paso, fueron transferidos al medio de enraizamiento correspondiente al medio descrito antes pero sin BAP.

Para verificar la efectividad de la 10 transformación, los callos, brotes, raíces y hojas fueron probados regularmente por la expresión del reportero uida por ensayo histoquímico GUS (Jefferson et al., J. EMBO 6 (1987), 3901-3907).

Después de este procedimiento, fueron 15 seleccionadas varias plantas individuales y propagadas in vitro o por medio de microcortes. Algunas de ellas fueron transferidas a un invernadero para lograr su desarrollo. No se observaron anomalías morfológicas.

20 VIII. Análisis de embriones somáticos de plantas de café transformadas

También se indujeron embriones somáticos de explantes de hoja para detectar la presencia de ARNm antisentido de α -galactosidasa. Las proteínas de 25 almacenamiento del café 11S fueron detectadas en embriones somáticos (Yuffa et al., Plant Cell Rep. 13 (1994) 197-

202), sugiriendo que el promotor *cspI* está activo en este tejido. En este caso, el análisis de los embriones somáticos inducidos de hojas de plantas de café transgénicos permitirán detectar la presencia de ARNm antisentido de α -galactosidasa primero que en los granos.

Entonces se extrajeron los ARN totales de 100 mg de embriones somáticos transformados como se describió anteriormente y se probaron por RT-PCR usando el equipo sistema de RT-PCR de acceso (Promega, EUA). En primer lugar, se confirmó la presencia de ADN específico de 11S efectuando una RT-PCR usando los cebadores localizados en la secuencia codificadora del ADNc de 11S. Esto se efectuó usando los cebadores SO11 correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 18 y SO2-1 correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 19. El cebador SO11 corresponde a la secuencia entre los nucleótidos 1035 y 1059 de la secuencia publicada por Marraccini et al., *supra*. Por otro lado, el cebador SO2-1 corresponde a los últimos 24 nucleótidos de la secuencia publicada. La síntesis de la primera hebra del ADNc (paso de transcripción inversa) se efectuó de acuerdo a lo descrito por el proveedor (45 min, 48°C). Los siguientes parámetros fueron utilizados por la reacción de PCR: 45 ciclos (60 seg a 94°C para el paso de desnaturalización, 90 seg a 52°C para el paso de recocido, 4 min a 68°C para el paso de alargamiento) con una obtención final de 68°C durante 7 min.

En este experimento se obtuvo un producto de la PCR de 1590 pb correspondiente a la secuencia de ADNc de 11S flanqueada por los cebadores S011 y S02-1. El resultado confirmó que el ARNm de 11S estuvo ausente de todo el tejido probado, es decir, las raíces, hojas, flores, pero estuvo efectivamente presente en embriones somáticos de *Coffea canephora* así como en semillas a las 27 WAF.

En segundo lugar, se probó la presencia del ARNm sentido del α -galactosidasa efectuando una reacción de RT-PCR usando únicamente el cebador B33, correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 21 durante la fase de transcripción inversa (condición 1). Este cebador corresponde a la secuencia complementaria de los nucleótidos 1286 a 1314 de la secuencia SEQ ID NO: 1.

En paralelo, se efectuó la detección del ARNm antisentido de la α -galactosidasa usando únicamente el cebador B11 durante la fase de transcripción inversa (condición 2). Este cebador corresponde a la secuencia entre los nucleótidos 50 y 78 de la secuencia SEQ ID NO: 1. Después de esta transcripción inversa (45 min, 48°C), la mezcla de reacción fue tratada a 94°C durante 1 min para inactivar la transcriptasa inversa MMLV. El oligonucleótido ausente, B11 en la condición 1 y B33 en la condición 2, fue agregado y la reacción continuó por medio de una PCR: 45 ciclos (60 seg a 94°C para el paso de desnaturalización, 90 seg a 45°C para el paso de recocido, 4 min a 68°C para el

paso de alargamiento) con una extensión final a 68°C durante 7 min. Usando las células somáticas de *C. arabica* no transformada, se observó un producto de amplificación de 1310 pb para el experimento en la condición 1 pero no para la condición 2. Sin embargo, para embriones somáticos obtenidos de una plántula de café transformada por el vector pBIA9, fue posible detectar un producto de amplificación durante la condición experimental 2, confirmando la presencia del ARNm antisentido de la α -galactosidasa.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de planta de café, que produce galactomananos, célula la cual se caracteriza por haber sido modificada de modo que el nivel endógeno de actividad de α -galactosidasa se reduzca de modo que se incremente la ramificación de la galactosa de los galactomananos.

2. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque contiene un ácido nucleico que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo derivada del gen de la α -D-galactosidasa.

3. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el ácido nucleico que es transcrito a un ácido ribonucleico, el cual es antisentido al ARNm, o una parte del mismo, derivado del gen de la α -D-galactosidasa está bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.

4. La célula de planta de café de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el promotor es el promotor *cspI* del café.

5. Una planta de café, caracterizada porque comprende una célula de planta de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

6. Un método para preparar café soluble, caracterizado porque comprende el paso de usar semillas de

café derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 5.

7. Un método para incrementar la solubilidad del café, caracterizado porque incluye el paso de usar
5 semillas de café derivadas de una planta de conformidad con la reivindicación 5.

8. El uso de semillas derivadas de una planta de café de conformidad con la reivindicación 5, para la preparación de café soluble.

10

Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1

TGCTCCACAAAGCAGTGGCAATGAGTTGATTGATCAACACCAATTTACCATGGCOGCTGCTT
 5 ATTACTACCTTTTTTCTAGTAAAAAAGCCACCAAAAGCTGGTGCTCOGAGCTTCGTTATTGA
 TGTTTTTATGTTTCTGGGGGTGAAAAAGTTGGTGCTTCOGCTCGCOGGATGGTGAAGTCTC
 CAGGAACAGAGGATTACACTCGCAGGAGCCTTTTAGCAAATGGGCTTGGTCTACACCACCGA
 TGGGGTGGAAACAGCTGGAATCATTTCAGTTGTAATCTTGATGAGAAATTGATCAGGGAAACAG
 COGATGCAAGGCATCAAAGGGGCTTGCTGCACTGGGATATAAGTACATCAATCTTGATGACT
 10 GTTGGGCAGAACTTAACAGAGATTTCACAGGGGAATTTGGTTCTTAAAGGTTCAACATTOCCAR
 CAGGGATCAAAGCCTTAGCAGATTATGTTTCACAGCAAAGGCTTAAAGCTTGGAAATTTACTCTG
 ATGCTGGAACTCAGACATGTAGTAAACTATGCCAGGTTTATTAGGACACGAAGAACAGACA
 CCAAAACCTTTGCTTCATGGGGGGTTGATTACTTAAAGTATGACAACTGTAAAGCAACAACA
 TAAGCCCCAAGGMAGGTATCCAATCATGAGTAAAGCATTGTTGAACTCTGGAAGGTCCATAT
 15 TTTTCTCTCTATGTGAATGGGGAGATGAAGATCCAGCAACATGGGCAAAGAAGTTGGAAACA
 GTTGGAGAAOCCACTGGAGATATAGATGACAGTTGGAGTAGCATGACTTCTCGGSCAGATATGA
 ACGACAAATGGGCATCTTATGCTGGTCCCGGAGGATGGAATGATCCTGACATGTTGGAGGTGG
 GAAATGGAGGCATGACTACAACGGAATATOGATCCATTTCAGCATTTGGGCATTAGCAAAG
 CACCTCTACTGATTGGCTGTGACATTGATCCATTGAAGGTGCGACTTTCCAACGTGTAAGCA
 20 ATGCGGAAGTTATTGCGGTAAACCAAGATAAACTTGGOGTICAAGGGAAAAAGGTTAAGACTT
 ACGGAGATTTGGAGGTGTGGGCTGGACCTCTTAGTGGAAGAAGTAGCTGTGCTTTGTGGA
 ATAGAGGATCTTCCACGGCTACTATTACOGOGIATTGGTCCGACGTAGGCCCTCCCGTCCACGG
 CAGTGGTTAATGCACGAGACTTATGGGGGCATTTCOGAAAAATCAGTCAAAGGACAAATCT
 CAGCTGCAGTAGATGCCACGATTGAAAAATGTATGTCTTAACCCACAGTGATTAAACAGGAG
 25 AATGCAGAAGACAAGTGATGGTTGGCTCTTICAAGGATTTGATTACCTTAAAGIAATTTTTTCAC

ATGTTATGAATCAATTCAAAGCAATTATGIGTTTTGAAGACATTAACTCAATAAAT

SEQ ID NO: 2

MAAAYYYLFSSKKSHQKLVLRASLLMFLCFLAVENVGASARRMVKSPGTEDYTRRS
5 LLANGLGLTPPMGWNSWNHFSNLDKLIRETADAMASKGLAALGYKYINLDDCW
AELNRDSQGNLVPKGSTFPSTGKALADYVHVKOLKLGISDAOTQTCSTMPGSLGH
EEQDAKTFASWGVLDYLYDNCNDNNISPKERYPIMSKALLNSGRSIFSLCEWGED
PATWAKEVGNSWRRTGDIIDSWSSMTSRADMNDKWASYAGPGGWNDPDMLEVG
NGGMTTTEYRSHFSIWALAKAPLLIGCDIRSIDGATFQLLSNAEVIQVNDKLGVOG
10 KKVKTGYDLEWAGPLSGKRVAVLWNRGSSTATITAYWSDVGLPSTAVVNARDL
WAHSTEKSVKGQISAAVDAHDSKMYVLTPQ

SEQ ID NO: 3 (BETA1)

ATGGTGAAGTCTCCAGG
15

SEQ ID NO: 4 (BETA3)

TCACTGTGGGGTTAGGA

SEQ ID NO: 5 (BETA 100)

20 TGCTCCACAAAGCAGTGGCAATT

SEQ ID NO: 6 (BETA101)

ATTTATTGACTTAATCTCTTCAA

25 SEQ ID NO 7: 210-1

CGGGGTACCCCGCCTCTTTTCTTTTGGAGTACAAG

SEQ ID NO 8: BAGUS 2

CGCGGATCCGCGTCTCTGACAACAGAGGAGAGTGT

5

SEQ ID NO: 9. *KpnI*

CGGGGTACCCCG

SEQ ID NO 10: *DamHI*

10

CGCGGATCCGCG

SEQ ID NO 11: UP213-1

CGGGGTACCCCGACAAAAGATTGAACAATACATGTC

15

SEQ ID NO12:TNOS1

CGCGGATCCGCGGAGCTCGAATTTCCCGATCGTT

SEQ ID NO 13: TNOS2

CGGGGTACCCCGGAATTCCCGATCTAGTAACATAG

20

SEQ ID NO 14: BETA100BI

CGCGGATCCGCGTGCTCCACAAAGCAGTGGCAATT

SEQ ID NO 15: BETA101BI

CGCGGATCCGCGATTTATTGACTTAATCTCTTCAA

25

SEQ ID NO 16: UPSAL1

CACGCGTCGACCCTCCACCGCQGTGGCGGCCGCTC

SEQ ID NO 17: UPSAL2

5 GGGCCCCCCTCGAGGTCGACGG

SEQ ID NO 18: S011

TTCTTTTGTTCCTCGGCTGTTTG

10 SEQ ID NO 19: S02-1

CCAAACATCAAAC TTCTCGCAATC

SEQ ID NO: 20 (BETA11)

ATGGCCGCTGCTTATTACTACCTTTTT

15

SEQ ID NO: 21 (BETA33)

TCACTGTGGGGTTAGGACATACATTTT

66
63

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 84432188 00000000
Fecha (AMB): 2004-04-05 17:26:47
Trámite : 011 PCI-PROLINT 379 FASE NACI 411 PROCEDIM
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Industria y Comercio
PERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [x] MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [] 36
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [] 2

COMPLETA ☒ [] INCOMPLETA ☐ []

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ [] INCOMPLETA ☐ []

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ [] INCOMPLETA ☐ []

Claudia M. Neva
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

+-----+	
ACCION: Consultar Siguiente Anterior Ir al detalle Primero ...	
Seleccionar un(os) Registros	
+-----+	
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	SISTEMA DE REGISTRO
Fecha 11/05/2004	
+-----+	
MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS	
Numero : 11145	
Fecha : 05/09/1986	
Conferido: SOCIETEDS PRODUITS NESTLE S.A.	
+-----+	
Pais : CH SUIZA	
Ciudad : 5 VEVEY, CANTON DE VAUD	
Represent: S Sustituir: S Desistir: S	
No. Radicacion: Clase: Seev: Seac:	
+-----+	
scencia	Codigo Ctr Nombre
1	231 A LLOREDAMACHO JOSE
2	231 B LLOREDAMACHO ANTONIO
3	231 C LLOREDAMACHO LUIS FERNANDO
Encontrados (1/1) registro(s)	
+-----+	



108
65

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
JOSE ANTONIO LLOREDA
Apoderado

Oficio N° 05203

ASUNTO:	Radicación N°	04-32188
	Solicitud internacional	PCT/EP02/8148
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

21 MAYO 2004

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.