

Reivindicaciones

1. Un producto de tabaco con niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) que se genera a partir de una planta de tabaco, dicha planta de tabaco se modifica para comprender:

- (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada;
- (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido que se expone en (i);
- (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada; o
- (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el polinucleótido que se expone en (i),

donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control;

y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende:

(a) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4 o

(b) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4, donde el aminoácido en la posición 523 de la sec. con núm. de ident.: 4 se sustituye por un ácido aspártico.

2. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 1, donde la enzima nitrato reductasa desregulada es una enzima nitrato reductasa que es constitutivamente activa.

3. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el producto de tabaco comprende material de planta de una planta de tabaco de la especie *Nicotiana tabacum*.

5 4. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada es un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido de nitrato reductasa modificada.

5. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 4, el polinucleótido heterólogo está enlazado a un promotor que no está asociado de manera natural con un gen de nitrato reductasa endógena.

10 6. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 5, donde el promotor es el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S.

7. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada comprende una secuencia e polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 5.

15 8. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polinucleótido que codifica una nitrato reductasa desregulada es un gen de nitrato reductasa endógeno que se modificó por un sistema de edición de genomas o por un mutagén.

20 9. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 8, donde el sistema de edición de genomas comprende un sistema basado en CRISPR/Cas diseñado, una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción diseñada, una nucleasa de dedos de zinc diseñada o una meganucleasa diseñada.

10. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde el tabaco es un tabaco Burley.

25 11. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, que tiene niveles reducidos de nitrosamina específica del tabaco (TSNA) en

comparación con un producto de tabaco derivado de una planta de tabaco de control en la que la enzima nitrato reductasa no se desreguló.

12. Un producto de tabaco de la reivindicación 11, donde el nivel de TSNA total se mide en una hoja de la planta de tabaco, donde

- 5
- (a) la hoja es recién cosechada;
 - (b) la hoja es curada, almacenada o procesada; o
 - (c) la hoja es curada al aire.

13. El producto de tabaco de la reivindicación 11 o reivindicación 12, donde el nivel de al menos una TSNA en el producto de tabaco es menor en comparación con un nivel de control para al menos una TSNA, donde al menos una TSNA se selecciona del grupo que consiste en 10 *N*-nitrosonornicotina (NNN), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*-nitrosoanabasina (NAB), *N*-nitrosoanatabina (NAT) y combinaciones de estas.

14. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 50%.

15

15. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 11, donde los niveles de TSNA se miden en el humo obtenido de la combustión de hojas de la planta de tabaco.

16. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 15, donde los niveles totales de TSNA se reducen en al menos 70%.

20

17. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde el nivel de NNN se reduce en aproximadamente 90%.

18. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde el nivel de NNK se reduce en aproximadamente 66%.

19. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, donde el nivel de NAB se reduce en aproximadamente 92%.

20. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, donde el nivel de NAT se reduce en aproximadamente 88%.

21. Un producto de tabaco de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde la planta de tabaco comprende además un gen de la vía de nor nicotina
5 modificado.

22. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 21, donde el gen de la vía de nor nicotina modificado comprende un gen de nicotina desmetilasa modificado o un gen citocromo P450.

23. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 21 o reivindicación 22,
10 donde la planta de tabaco comprende un gen CYP82E4 modificado o un gen CYP82E10 modificado.

24. Un producto de tabaco de conformidad con la reivindicación 23, donde el gen CYP82E4 modificado o gen CYP82E10 modificado están inactivados.

25. Un método para producir un producto de tabaco donde los niveles de TSNA medidos
15 en el humo obtenido de la combustión de hojas de una planta de tabaco modificada se reducen en comparación con los niveles de TSNA medidos en el humo obtenido de la combustión de una planta de tabaco no modificada, que comprende:

(a) modificar una planta de tabaco para que comprenda:

- 20
- (i) un polinucleótido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia que codifica una enzima nitrato reductasa desregulada;
 - (ii) un polipéptido codificado por el polinucleótido que se expone en (i);
 - (iii) un polipéptido que comprende, consiste o consiste esencialmente en una enzima nitrato reductasa desregulada; o
 - (iv) una construcción, vector o vector de expresión que comprende el
25 polinucleótido que se expone en (i),

donde la expresión o actividad de dicha nitrato reductasa está desregulada en comparación con una planta de tabaco no modificada de control;

y donde la enzima nitrato reductasa desregulada comprende:

(I) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con
5 núm. de ident.: 4 o

(II) un polipéptido de nitrato reductasa que comprende una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a la posición 523 de la sec. con
núm. de ident.: 4, donde el aminoácido en la posición 523 de la sec. con núm.
10 de ident.: 4 se sustituye por un ácido aspártico;

- (b) cosechar hojas de tabaco de dicha planta de tabaco modificada; y
- (c) producir un producto de tabaco a partir de las hojas cosechadas.