

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 393**

21 Número de solicitud: 201630185

51 Int. Cl.:

C12N 15/83 (2006.01)

12

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

R1

22 Fecha de presentación:

21.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.05.2019

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

10.09.2019

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

P 201490032 21.09.2012

71 Solicitantes:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville US**

72 Inventor/es:

**DAWSON, William O.;
FOLIMONOVA, Svetlana Y. y
EL-MOHTAR, Chooa**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Vectores basados en el virus de la tristeza de los cítricos para la expresión de gen(es) exógeno(s)**

57 Resumen:

Vectores basados en el virus de la tristeza de los cítricos para la expresión de gen(es) exógeno(s).

En el presente documento se divulgan vectores víricos basados en modificaciones del virus de la tristeza de los cítricos útiles para transfectar árboles cítricos para fines beneficiosos. Se incluyen en la divulgación vectores víricos que incluyen uno o más casetes génicos que codifican polipéptidos heterólogos. Los casetes génicos están colocados en localizaciones deseables en el genoma vírico, tales como la región p23-3'NTR, de modo que se permita la expresión al tiempo que se conserva la funcionalidad del virus. También se divulgan métodos de transfectar plantas y plantas transfectadas con formas de realización del vector vírico.



- ②① N.º solicitud: 201630185
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.09.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/83** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FOLIMONOV, A. S. et al. A stable RNA virus-based vector for citrus trees. <i>Virology</i> . Noviembre 2007, Vol. 368, Nº 1, páginas 205 - 216, ISSN 0042-6822, <DOI: 10.1016/j.virol.2007.06.038>. Ver especialmente páginas 206, 208, 210, 212, 2013; figura 1.	1-23
X	US 2010/0017911 A1 (DAWSON, WILLIAM O. et al.) 21/01/2010, ejemplos 2, 3, 5-7; figura 1.	1, 2
A		3-23
A	GOWDA, S. et al. The p20 gene product of <i>Citrus Tristeza Virus</i> accumulates in the amorphous inclusion bodies. <i>Virology</i> . Septiembre 2000, Vol. 274, Nº 2, páginas 246 - 254, ISSN 0042-6822, <DOI: 10.1006/viro.2000.0413>. Ver especialmente página 249, columna derecha, segundo párrafo; página 253, columna derecha, segundo párrafo.	1, 2, 5, 7, 8, 11-13, 15, 16, 19-23
A	HAGIWARA, Y. et al. Regulation of Closterovirus gene expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. <i>Journal of Virology</i> . Octubre 1999, Vol. 73, Nº 10, páginas 7988-7993, ISSN 0022-538X. Todo el documento.	8, 9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.08.2019

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/6

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.08.2019

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-23	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-23	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FOLIMONOV, A. S. et al. Virology. Noviembre 2007, Vol. 368(1), pág. 205-216.	10.11.2007
D02	US 2010/0017911	21.01.2010
D03	GOWDA, S. et al. Virology. Septiembre 2000, Vol. 274(2), pág. 246-254.	01.09.2000
D04	HAGIWARA, Y. et al. Journal of Virology. Octubre 1999, Vol. 73(10), pág. 7988-7993.	10.1999

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

El objeto de la búsqueda ha sido un vector vírico basado en el virus de la tristeza en cítricos (CTV) que comprende al menos un casete génico situado entre el gen p23 y la región no traducida 3' del virus (3' NTR), comprendiendo dicho casete de 5' a 3': un elemento controlador de ARNm subgenómico (CE), y un polinucleótido que codifica para un péptido heterólogo (reivindicaciones 1 y 2) o polinucleótido que codifica para un péptido heterólogo, una proteasa y un segundo péptido heterólogo, donde se han incluido sendos sitios de escisión en ambos extremos de la proteasa (reivindicaciones 5-7). También ha formado parte de la búsqueda, un vector vírico basado en el CTV que comprende al menos un casete génico situado entre el gen p23 y la 3' NTR, que comprende una secuencia que codifica para una proteína de fusión formada por un gen heterólogo, una proteasa en posición central y una proteína viral, presentando la secuencia codificante para proteasa sitios de escisión en ambos extremos (reivindicaciones 8 y 9). El vector de la reivindicaciones 1 ó 2 puede comprender al menos dos casetes génicos en el mismo o en diferentes *loci* (reivindicaciones 11-13, 15, 16, 19-23). Por último, también se ha considerado como objeto de la búsqueda, un procedimiento de infección de un árbol para expresar un péptido heterólogo que comprende la transfección de al menos una célula de dicho árbol con el vector de las reivindicaciones 1 (reivindicaciones 3 y 4), 11 (reivindicación 14), 15 (reivindicación 17) o 16 (reivindicación 18) o con el vector de reivindicación 1 que comprende dos péptidos heterólogos en el casete génico (reivindicación 10).

1 NOVEDAD (Art 6.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIÓN 1**

D01 y D02 divulgan la existencia de un vector derivado del CTV al que se ha fusionado la ORF de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo 3' de p23. Este vector viral es capaz de replicarse en protoplastos y de expresar la GFP (ver página 208, primer párrafo en D01 y párrafo [0020] en D02).

Por lo tanto, ambos documentos divulgan de manera inequívoca un vector vírico basado en el CTV que comprende al menos un casete génico situado entre el gen p23 y la 3' NTR, comprendiendo dicho casete un polinucleótido que codifica para un péptido heterólogo (reivindicación 1).

En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva a la luz de cualquiera de los documentos D01 o D02 (art. 6.1 LP 11/1986).

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 2 A LA 23

Las reivindicaciones de la 2 a la 23 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art 8.1 LP 11/1986)**2.1. REIVINDICACIÓN 1**

Por los mismos motivos señalados en el apartado 1.1, la reivindicación 1 no presenta actividad inventiva en vista de las características técnicas divulgadas en cualquiera de los documentos D01 o D02 (art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIÓN 2

Si bien en ninguno de los documentos D01 o D02 se especifica que el vector presente un elemento controlador subgenómico (CE) en posición 5' respecto al gen heterólogo, es sobradamente conocido en el estado de la técnica, el diseño de un vector con un CE en posición 5' respecto al gen heterólogo. De hecho, se anticipa en otros vectores desarrollados tanto en D01 como en D02 (ver figura 1 de ambos documentos) y se encuentra implícito en los vectores divulgados en D03 y D04, ya que la expresión de las ORF de los genes víricos a los que se fusiona el gen heterólogo está regulada por un CE que se encuentra situado en posición 5' con respecto al gen vírico y que por lo tanto, se encuentra en posición 5' del gen de fusión.

Así pues, se considera que la reivindicación 2 no tiene actividad inventiva a la vista del estado de la técnica divulgado en cualquiera de los documentos D01 o D02 (art. 8.1 LP 11/1986).

2.3. REIVINDICACIONES 3 Y 4

En D01 se afirma que el constructo en el que se ha fusionado la ORF de la GFP al extremo 3' de p23, si bien se replica eficientemente en protoplastos, no es capaz de infectar plantas. Sin embargo, una de las posibles razones que se alega, es que la proteína de fusión no sea funcional en plantas, no contemplándose en ningún momento que el *locus* situado entre p23 y la 3' NTR no fuera adecuado para la inserción de un casete génico (página 208, primer párrafo).

Por otro lado, en D01 se optimizan varios vectores derivados del CTV que comprenden un casete génico con un CE adicional en posición 5' con respecto a la GFP. Estos vectores expresan el gen heterólogo mediante la síntesis de un ARNsg adicional y son capaces de infectar cítricos (ver página 208, columna derecha, segundo párrafo; página 210; figura 1). La diferencia del método divulgado en D01 con respecto al de las reivindicaciones 3 ó 4, es que el vector utilizado en D01 tiene el casete génico entre los genes CPm y CP en vez de entre p23 y la 3' NTR. Sin embargo, es importante señalar, que en el apartado "Discussion", página 212, columna derecha, segundo párrafo, se afirma al respecto que, como los genes localizados más cerca del extremo 3' terminal tienden a expresarse más, posiblemente otras posiciones funcionen incluso mejor. Además, en la página 206, columna izquierda, segundo párrafo, no solo se anticipa que los genes situados más cerca del extremo 3' tienden a expresarse más, sino que se divulga que p23 es de los genes cuyo ARNsg presenta un mayor nivel de expresión. Es decir, se está dirigiendo al experto en la materia a probar a modificar la construcción desarrollada en D01, insertando el casete de expresión en un *locus* situado más cerca del extremo 3'.

Por lo tanto, a partir de las enseñanzas derivadas del documento D01, y dado que el *locus* situado entre p23 y el 3' NTR se encuentra cerca del extremo 3', un experto en la materia intentaría optimizar un vector de expresión derivado del CTV mediante la inserción del casete génico divulgado en D01 entre p23 y la 3' NTR, y desarrollar de un procedimiento de infección de un árbol cítrico que comprendiera transfectar al menos una célula del árbol con dicho vector, con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, las reivindicaciones 3 y 4 no tienen actividad inventiva a la luz de D01 (art. 8.1 LP 11/1986).

2.4. REIVINDICACIONES DE LA 5 A LA 7 Y 10

En las reivindicaciones de la 5 a la 7 se especifica que el casete de expresión comprende de 5' a 3', un CE y un polinucleótido que codifica para una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido heterólogo, una proteasa y un segundo polipéptido heterólogo, presentado la secuencia de la proteasa modificaciones en ambos extremos para incluir sitios de escisión.

Este tipo de diseños en el que se incluye una proteasa para la expresión de una poliproteína que se escinde en los péptidos de interés, es habitual en el estado de la técnica.

Por el mismo motivo, un procedimiento de infección de un árbol que comprenda transfectar al menos una célula del árbol con el vector de expresión de la reivindicación 1 que comprenda dos genes heterólogos en el casete génico del vector (reivindicación 10), tampoco se considera inventivo.

Consecuentemente, dado D01 las reivindicaciones de la 5 a la 7 y 10 no presentan actividad inventiva (art. 8.1 LP 11/1986).

2.5 REIVINDICACIONES 8 Y 9

En las reivindicaciones 8 y 9 la estrategia para la expresión del gen heterólogo, no es la síntesis de un ARNsg adicional, sino la fusión de su ORF a la de una proteína viral, para la formación así de una poliproteína que será escindida gracias a la proteasa.

Esta estrategia es una de las opciones sobradamente conocidas en el estado de la técnica a la hora de diseñar un vector de expresión heterólogo. Así, por ejemplo, en D01 (página 208, columna izquierda), D02 (ejemplo 2) y D04, se divulgan diversas construcciones de closterovirus en las que se utiliza esta estrategia y que se obtienen vectores de expresión funcionales en protoplastos.

En consecuencia, a la luz de D01, las reivindicaciones 8 y 9 no tienen actividad inventiva.

2.6 REIVINDICACIONES DE LA 11 A LA 23

El objeto de las reivindicaciones de la 11 a la 13, 15, 16 y de la 19 a la 23, son diversas construcciones del vector objeto de la reivindicación 1 que comprenden uno o varios casetes génicos adicionales situados entre p23 y 3'NTR o en otros *loci* del vector.

Es conocido en el estado de la técnica la inserción de varios casetes génicos en vectores virales. De hecho, en D01 página 213, columna derecha, segundo párrafo, se invita al experto en la materia a probar la inserción de otros genes en otras regiones con el fin de conseguir la expresión de múltiples genes heterólogos.

En consecuencia, se entiende que las reivindicaciones de la 11 a la 13, 15, 16 y de la 19 a la 23, no cumplen el requisito de actividad inventiva en vista de D01.

Por este mismo motivo, un procedimiento de infección de un árbol que comprenda transfectar al menos una célula del árbol con un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11, 15 o 16 (reivindicaciones 14, 17 y 18 respectivamente), tampoco se considera inventivo a la luz de D01.

Es decir, se entiende que las reivindicaciones de la 11 a la 23 no tienen de actividad inventiva en vista de la información divulgada en D01 (art. 8.1 LP 11/1986).

3. CONCLUSIONES.

Se puede considerar a partir de la reivindicación 1, que la clave de la invención sería un vector derivado del CTV que presenta un gen heterólogo entre p23 y la 3'NTR, habiéndose divulgado vectores con esta característica técnica tanto en D01 como en D02.

Por otro lado, en líneas generales, hay dos estrategias para conseguir la expresión del gen heterólogo. La primera es el diseño de un vector basado en el CTV que exprese un ARNsg adicional con la secuencia del gen heterólogo. Una segunda estrategia es la fusión del gen heterólogo junto con el gen de una proteasa a la ORF de un gen vírico. En esta segunda opción se traduce una poliproteína que será escindida gracias a la actividad de la proteasa en las proteínas de interés.

Ambas estrategias, se encuentran divulgadas en D01 en vectores cuyo gen heterólogo se encuentra insertado entre los genes CPm y CP, donde además se invita y dirige al experto a la optimización de los vectores conseguidos, indicando posibles soluciones a los problemas encontrados y orientando al mismo a la búsqueda de otros *locus* de inserción hacia el extremo 3' (ver apartado 2 del presente informe para más detalle). En consecuencia, se entiende que los vectores reivindicados son el resultado de la puesta en práctica de las enseñanzas derivadas de la lectura de D01, no implicando en sí actividad inventiva.

Además, dada la ambigüedad de la descripción al respecto y la amplitud del alcance de las reivindicaciones, no se puede deducir ni un efecto técnico sorprendente derivado del diseño de los vectores reivindicados, ni que para su obtención se hayan tenido que superar dificultades mayores de las habituales en este campo técnico.

En consecuencia, la reivindicación 1 no cumple el requisito de novedad a la luz de cualquiera de los documentos D01 o D02 (art. 6.1 LP 11/1986), considerándose nuevas las reivindicaciones de la 2 a la 23 (art. 6.1 LP 11/1986). Por otro lado, la reivindicación 2 no presenta actividad inventiva dado cualquiera de los documentos D01 o D02 (art. 8.1 LP 11/1986) y las reivindicaciones de la 3 a la 23 no cumplen el requisito de actividad inventiva a la luz del estado de la técnica divulgado en D01 (art. 8.1 LP 11/1986).