



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 329 450**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **02748684 .4**

⑨6 Fecha de presentación : **29.04.2002**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1499734**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

⑤4 Título: **Proceso para producir organismos transgénicos ambientalmente seguros.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2009

⑦3 Titular/es: **Icon Genetics GmbH**
Briennerstrasse 12A
80333 München, DE

⑦2 Inventor/es: **Werner, Stefan;**
Marillonnet, Sylvestre;
Klimyuk, Victor y
Gleba, Yuri

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 329 450 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir organismos transgénicos ambientalmente seguros.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para producir un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés y que tiene una distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia o a otros organismos. La invención se refiere además a un organismo vegetal multicelular que expresa un rasgo, mediante el cual se controla la distribución de dicho rasgo a la descendencia, es decir, la probabilidad de transferir dicho rasgo a la descendencia, en particular por polinización cruzada, es muy baja. Estas invenciones se refieren preferiblemente a plantas multicelulares.

Antecedentes de la invención

El uso comercial de especies de cultivo sometidas a ingeniería genética ha provocado preocupaciones acerca de la posible transferencia de transgenes y rasgos codificados por transgenes vegetales modificados genéticamente (plantas GM) en variedades autóctonas, parientes silvestres u otras variedades de plantas no GM o especies de cultivo relacionadas (Ellstrand, N. C., 2001, *Plant Physiol.* 125, 1543-1545; Quist & Chapela, 2001, *Nature*, 414, 541-543), los cuales podrían cambiar el equilibrio ecológico en los ecosistemas afectados o conducir a otros problemas, primero que nada, socioeconómicos. Adicionalmente, existe cierto temor de que los transgenes, especialmente los genes de resistencia a antibióticos usados como marcadores de transformación, puedan escapar a través de la denominada transferencia horizontal a microorganismos circundantes (Chiter *et al.*, 2000, *FEBS Lett* 481, 164-168), modificando de este modo la microflora de una manera indeseable.

Aunque muchas de estas preocupaciones no están bien justificadas científicamente (Christou, P., 2002, *Transgenic Res.*, 11, iii-v), la creación de sistemas de gestión de transgen seguros y controlados es altamente deseable, dado que puede evitar problemas potenciales en el futuro y ayudará a proteger al germoplasma de las especies de planta existentes de una manera más eficaz. Adicionalmente, existen problemas causados por contaminación de cultivos desarrollados orgánicamente o cultivos no GM con variedades cultivadas transgénicas. Esto tiene un impacto grave en la comercialización de cultivos transgénicos así como no transgénicos, un asunto que los productores no pueden ignorar.

Cualquier material transgénico creado por tecnología actual y liberado en el entorno tiene el potencial de persistir en el mismo durante un período de tiempo muy prolongado. La práctica común de ingeniería genética de vegetales se basa en el uso de casetes de expresión y vectores que contienen secuencias codificantes continuas para el gen de interés. Tales casetes de expresión se integran en un cromosoma hospedador y, tras la hibridación u otro intercambio de información genética entre una planta GM y otro organismo, lícito o ilícito, el casete de expresión se transmite con una alta probabilidad a la descendencia u otro receptor, como una unidad transcripcional funcional.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un proceso para producir un organismo transgénico, que expresa un rasgo de interés, mediante el cual la distribución de dicho rasgo a la descendencia se controla y se produce con probabilidad baja.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso controlado y biológicamente seguro para expresar un rasgo de interés en un organismo multicelular o una célula del mismo.

Descripción general de la invención

Los objetos anteriores se consiguen mediante un proceso (i) de producción de un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés y que tiene una distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia, donde dicho proceso comprende hibridar

un primer organismo multicelular o una célula del mismo que tiene una primera secuencia de ADN heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia que codifica dicho rasgo de interés y

un segundo organismo multicelular o una célula del mismo que tiene una segunda secuencia de ADN heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia que codifica dicho rasgo de interés, por lo que dichas primera y segunda secuencias heterólogas se diseñan de manera que dicho rasgo de interés surja debido al corte y empalme *trans* de ARN después de dicha hibridación y por lo que dicho primer y dicho segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés están presentes en cromosomas alélicos, como se indica en las reivindicaciones nuevas 1 y 2.

También se describe un proceso (ii) de producción de un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés y que tiene una distribución controlada a la descendencia y expresión de dicho rasgo, comprendiendo dicho proceso el suministro de un organismo multicelular o una célula del mismo que tiene una primera secuencia de ADN heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia que codifica dicho rasgo de interés; y

la introducción de una segunda secuencia de ADN (o ARN) heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia que codifica dicho rasgo de interés dentro de una célula de dicho organismo multicelular,

por lo que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se diseñan de manera que la expresión de dicho rasgo de interés surja debido al corte y empalme *trans* de ARN después de que las células se han cambiado por dicha introducción. Se prefiere la producción de organismos vegetales multicelulares transgénicos.

Además, la invención proporciona organismos transgénicos vegetales obtenidos o que se pueden obtener por el proceso de la invención o como se ha indicado en la reivindicación 25.

Los inventores de esta invención han desarrollado por primera vez un método para volver a los organismos transgénicos ambientalmente seguros en la medida en que el transgen o el rasgo de interés expresado por dicho organismo tiene una distribución controlada para la descendencia del organismo. La invención resuelve un problema principal de biotecnología, en particular de biotecnología vegetal, dado que la transferencia de un transgen a partir de un organismo GM a otros organismos ahora se puede controlar y limitar eficazmente. La transferencia de un transgen a otros organismos incluye la transferencia a descendencia sexual por polinización cruzada así como transferencia lateral del gen. El proceso anterior vuelve asequibles organismos multicelulares modificados genéticamente con una contención controlada de un rasgo de interés.

En el proceso de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica o que está involucrada en dicho rasgo se divide en dos o más fragmentos. Preferiblemente, dicha secuencia de nucleótidos se divide en dos fragmentos. Dicha secuencia de nucleótidos típicamente es una secuencia codificante (o una fase de lectura abierta) de un ARN o, preferiblemente, de una proteína involucrada en dicho rasgo. Para obtener dichos fragmentos, la secuencia de nucleótidos preferiblemente se divide de manera que cada fragmento obtenido, tras la expresión, sea incapaz de generar dicho rasgo. La expresión de dicho rasgo requiere la presencia de ambos fragmentos en el mismo organismo, en particular en las mismas células del mismo, y la unión por empalme *trans* de los fragmentos. En este documento, la expresión incluye transcripción, preferiblemente la expresión incluye transcripción y traducción. Cada fragmento preferiblemente contiene una porción de secuencia necesaria para la función del ARN o proteína involucrada en dicho rasgo. Por ejemplo, si dicha proteína involucrada en dicho rasgo es una enzima, cada fragmento preferiblemente contiene aminoácidos necesarios para catálisis o unión de sustrato de la enzima.

La siguiente descripción se enfoca en la realización preferida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se divide en dos fragmentos. El primer fragmento se incorpora en una primera secuencia heteróloga, el segundo fragmento se incorpora en una segunda secuencia heteróloga, por lo que por lo menos dicha primera secuencia heteróloga es una secuencia de ADN. En dicho proceso (i) ambas secuencias heterólogas son secuencias de ADN. En dicho proceso (ii), dicha primera secuencia heteróloga es ADN, mientras que dicha segunda secuencia heteróloga puede ser una secuencia de ARN o de ADN. Cada secuencia heteróloga preferiblemente contiene, además de dicho fragmento, las secuencias necesarias para, por ejemplo, transcripción como un promotor y una señal de terminación de transcripción o secuencias necesarias para traducción.

Dichas primera o segunda secuencias heterólogas contienen además o codifican una secuencia capaz de empalme *trans* de ARN con dicha segunda y/o dicha primera secuencia heterólogas, respectivamente, para unir dicho primer y dicho segundo fragmentos por empalme *trans*. Dicha secuencia capaz de empalme *trans* de ARN puede ser una ribozima (Rz) capaz de empalme *trans*. La ribozima de empalme *trans* se puede seleccionar del siguiente grupo: ribozimas derivadas de intrón grupo I, ribozimas derivadas de intrón grupo II y otras ribozimas diseñadas natural o artificialmente capaces de empalme *trans* de ARN específico. Además, el empalme *trans* puede ser mediado por espliceosomas.

El proceso de la invención también se puede usar para ensamblar dos o más rasgos mediante empalme *trans*. Esto se puede realizar como se ejemplifica en el ejemplo 1 y la Figura 5 al tener 2 fragmentos involucrados en un rasgo (o involucrados en dos rasgos) en cada secuencia heteróloga.

El empalme *trans* eficaz de la primera y segunda secuencia heterólogas posee ciertos requerimientos para dichas secuencias heterólogas. Entre otros, la homología del bucle P1 de la ribozima con el extremo 3' del fragmento de empalme 5' puede generar restricciones de la secuencia de base del fragmento de empalme 5'. Con el fin de evitar tales restricciones, dicha primera o dicha segunda secuencias heterólogas pueden contener un intrón o una parte del mismo de manera tal que el producto de ARN de la reacción de empalme *trans* contenga un intrón capaz de empalme *cis*. En particular, las secuencias necesarias para el empalme *trans* en la primera y la segunda secuencias de ADN heterólogas se incorporan en tal intrón de autoempalme. Dicho intrón de autoempalme después se puede ensamblar en la reacción de empalme *trans*. Después del empalme *trans*, cualquier secuencia o secuencias no deseadas necesarias para el empalme *trans* se pueden cortar del producto de la reacción de empalme *trans* mediante empalme *cis* (véase la Figura 4). En la técnica se conoce el diseño de los intrones de empalme *cis*.

En el proceso (i) de la invención, cada una de dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN heterólogas incorporadas en un organismo vegetal multicelular o células del mismo de acuerdo con los métodos conocidos generalmente en la técnica. Preferiblemente, por lo menos uno y, de manera más preferible, ambas de dichas secuencias heterólogas se incorporan de manera estable en un cromosoma del genoma nuclear del organismo. Dicho primero y dicho segundo organismos multicelulares obtenidos de esta manera preferiblemente se vuelven homocigotos con

respecto a las secuencias de ADN heterólogas respectivas, de acuerdo con procesos conocidos en la técnica. Dicho primero y dicho segundo organismos multicelulares pertenecen preferiblemente a la misma familia, de manera más preferible al mismo género y de manera mucho más preferible a la misma especie de organismos.

5 Dicha primera secuencia de ADN heteróloga en dicho primer organismo multicelular y dicha segunda secuencia de ADN heteróloga en dicho segundo organismo multicelular se pueden incorporar en el mismo cromosoma (homólogos) o en cromosomas diferentes (no homólogos). Se prefiere que se incorporen en el mismo cromosoma. De manera más preferible, se incorporan en el mismo locus del mismo cromosoma. Los métodos para obtener tales posiciones relativas de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se conocen en la técnica. Una posibilidad es producir muchos transformantes con cada una de dichas secuencias heterólogas. Después, el cromosoma que tenga dicha secuencia heteróloga incorporada así como la ubicación de la secuencia transformada en el cromosoma se determinan por métodos genéticos o de biología molecular. Posteriormente, se puede seleccionar un organismo multicelular transformado que tenga dicha secuencia heteróloga en un lugar adecuado. Esto se puede realizar con dicho primer y dicho segundo organismos multicelulares y se puede seleccionar un par adecuado del primer y segundo organismos. 10 Una posibilidad adicional es usar integración dirigida a un locus deseado de un cromosoma particular que hace uso de la recombinación homóloga. La integración dirigida preferiblemente se puede realizar usando una planta multicelular que tenga un sitio diana preintegrado en un cromosoma, en combinación con la recombinación específica de sitio. Este último enfoque es particularmente útil para introducir dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas en el mismo locus del mismo cromosoma, dado que la misma línea de organismo inicial que tiene el sitio diana preintegrado se puede usar para transformar dichas secuencias heterólogas. La integración dirigida se describe, por ejemplo, en la 15 solicitud de patente internacional PCT/EP02/03266.

En el proceso (i) de la invención, dicho primero y dicho segundo organismo multicelular o células del mismo se hibridan después para obtener el organismo vegetal multicelular transgénico de la invención. La hibridación puede ser un cruce sexual de organismos o fusión de células de dichos organismos. La fusión celular puede ser una fusión de células germinales o de células somáticas. 25

La hibridación puede involucrar polinización de las plantas o fusión de células somáticas de protoplastos. Lo más preferido es el cruce sexual de plantas. Dicha hibridación reúne dichos fragmentos que codifican o que están involucrados en dicho rasgo en un organismo, de manera que el rasgo de interés surge debido al empalme *trans* de ARN. El surgimiento debido al empalme *trans* de ARN significa que el empalme *trans* es una condición necesaria para la expresión de dicho rasgo de interés. La producción del organismo transgénico de la invención puede comprender etapas adicionales además de dicha hibridación. En el caso de plantas, los ejemplos de tales etapas adicionales incluyen: crecimiento y cultivo se semillas, siembra y crecimiento de la planta de la invención. En el caso de fusión de protoplastos, tales etapas adicionales incluyen: propagación de los protoplastos fusionados para obtener colonias y regeneración de plantas. 30 35

Varias ubicaciones relativas de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas así como los fragmentos respectivos existen en el organismo vegetal multicelular transgénico de la invención. Dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas en dicha planta o animal multicelular transgénico deben colocarse de manera que se segreguen como loci no relacionados. Dichos loci no relacionados preferiblemente se colocan de manera que minimizan la recombinación y enlaces entre dichos loci. Dichas posiciones relativas generalmente se muestran en la Figura 2B usan un organismo diploide como un ejemplo. 40

En el caso I de la Figura 2B, dichos fragmentos se localizan en el mismo cromosoma, es decir, están unidos físicamente en la misma molécula de ADN pero separados entre sí por secuencias de cromosoma nativas al organismo. Los fragmentos pertenecerán a unidades transcripcionales diferentes. Dado que el entrecruzamiento en la meiosis puede llevar a separación de los fragmentos (o las secuencias heterólogas que contengan los fragmentos), la probabilidad de transferencia del rasgo codificado por ambos fragmentos a la descendencia se reduce de manera significativa en comparación con el caso convencional, en donde el rasgo está codificado por una secuencia codificante continua. 45 50

En el caso II (véase la Figura 2B), dicho primer y dicho segundo fragmentos se localizan en cromosomas diferentes (cromosomas no homólogos, en oposición a cromosomas alélicos). La frecuencia de heredar dicho rasgo codificado por dos fragmentos en cromosomas diferentes tras el auto-cruce es de aproximadamente el 50% y tras el cruce con un organismo que no presenta ninguno de estos fragmentos, del 25%. Se prefiere el caso II con respecto al caso I. 55

En la invención (caso III en la Figura 2B), los dos fragmentos están presentes en cromosomas alélicos (homólogos). Cuanto más cerca se encuentran los fragmentos, menor será la frecuencia de transferencia del rasgo a la descendencia. En el caso más preferido (caso IV en la Figura 2B), los fragmentos se localizan en el mismo locus. Por lo tanto, el rasgo se segrega rápidamente en la descendencia cruzada del organismo vegetal multicelular de la invención. 60

La distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia se refiere a que la probabilidad de transferencia del rasgo a la descendencia se reduce de manera significativa en comparación con organismos transgénicos convencionales que tienen un transgen involucrado en dicho rasgo codificado en un locus de un cromosoma, en particular como una unidad transcripcional única. La frecuencia de aparición de dicho rasgo en la descendencia tras el cruce de dicho organismo multicelular transgénico de la invención con un organismo carente de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas es menor del 10%, preferiblemente menor del 1%, de manera más preferible del 0,1% e incluso de manera más preferible menor del 0,01% y de manera mucho más preferible menor del 0,001%. Para comparación, 65

la frecuencia de aparición de un transgen en la descendencia tras el cruce de un organismo transgénico convencional (diploide) que tiene dicho transgen en una unidad transcripcional única y que es heterocigoto con respecto al transgen con otro organismo de la misma especie que no tiene dicho transgen es de aproximadamente el 50%.

5 En el proceso (ii), el ensamblaje de ARN involucrado en un rasgo de interés no requiere la hibridación de organismos o células. No obstante, la especificación proporcionada anteriormente para el proceso (i) de la invención, también se aplica al proceso (ii) en donde es aplicable a menos que se especifique de manera diferente. En este segundo proceso, dicha primera secuencia heteróloga típicamente es ADN que se integra en el genoma nuclear de dicho organismo multicelular. Dicha segunda secuencia heteróloga puede ser ARN o ADN. Si es ADN, las secuencias que
10 permiten la transcripción (por ejemplo, un promotor funcional en el organismo) en dicho organismo deben proporcionarse con dicha segunda secuencia heteróloga para producir ARN susceptible de empalme *trans*. Dicha segunda secuencia heteróloga puede ser ARN, por ejemplo cuando se usa infección viral basada en un virus de ARN. No obstante, un segundo ARN heterólogo de ARN viral se puede introducir indirectamente al introducir ADN susceptible a transcripción al ARN.

15 Dicha segunda secuencia heteróloga de ADN o ARN puede o no incorporarse en el genoma nuclear del organismo multicelular. Preferiblemente, no se incorpora en el genoma nuclear. Esto permite un grado extremadamente alto de control de la distribución a la descendencia del rasgo codificado en dicho primero y dicho segundo fragmento.

20 El organismo multicelular o célula del mismo que tiene una primera secuencia de ADN heteróloga se puede proporcionar como se describe para el proceso (i). En contraste con el proceso (i) el organismo multicelular preferiblemente es heterocigoto con respecto a la primera secuencia heteróloga.

La introducción de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas puede ser un proceso de una etapa o de
25 dos etapas. En el proceso de una etapa, dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se introducen en un organismo multicelular junto o al mismo tiempo y, preferiblemente, por el mismo método de transformación. Dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se pueden introducir, por ejemplo, como una mezcla (por ejemplo, una mezcla de cepas de *Agrobacterium*, cada una que contiene una de dichas secuencias heterólogas en ADN-T de plásmidos Ti). En el proceso de dos etapas, el organismo multicelular o una célula del mismo que tenga la primera
30 secuencia de ADN heteróloga se produce en primer lugar y dicha segunda secuencia heteróloga se introduce en una etapa independiente. Estas dos introducciones se pueden llevar a cabo por métodos diferentes de transformación o transfección. Dicha introducción se puede realizar por infección viral, infección mediada por *Agrobacterium* o métodos de transformación no biológicos.

35 Con los procesos de la invención se producen organismos vegetales multicelulares transgénicos. Se prefieren las plantas de cultivo que incluyen cebada, avena, centeno, trigo, maíz, arroz, mijo, patata, semilla de colza, ajonjolí, tomate, algodón, sorgo y tabaco. Los procesos de la invención se pueden aplicar a plantas diploides y poliploides.

Los ejemplos de rasgos expresables de acuerdo con la invención, en particular en plantas, son esterilidad masculina,
40 resistencia a herbicidas, resistencia a insecticidas, un marcador contra-seleccionable, morfología del organismo, contenido de la semilla, estabilidad de la semilla, adaptación al clima, contenido de vitaminas, contenido y composición de carbohidratos, contenido y composición de grasas, etc. Además, dicho rasgo puede ser la expresión de una proteína de interés, en particular de una proteína farmacéutica. Los ejemplos de tales proteínas se proporcionan a continuación. En un caso preferido (véase ejemplo 1), dos rasgos se expresan en una planta de la invención, por ejemplo un gen de
45 un marcador seleccionable y un gen de interés que confiere un rasgo útil como resistencia a insectos.

Dichos organismos multicelulares y dichos organismos multicelulares transgénicos de la invención se pueden modificar adicionalmente de manera genética o transitoria, por ejemplo para proporcionar funciones necesarias para el empalme *trans* o dicha expresión del rasgo de interés. Además, se puede expresar un segundo transgen involucrado
50 en la expresión del rasgo de interés o de un rasgo diferente.

El proceso de la invención se puede usar para una amplia variedad de aplicaciones. Se puede usar, por ejemplo, para expresar un rasgo de interés en dicho organismo transgénico. Dicho rasgo puede ser cualquier propiedad de dicho organismo, ya sea codificado por un solo gen o por varios genes. El rasgo puede estar causado por la expresión de por lo menos un ARN o, preferiblemente, por la expresión de por lo menos una proteína. Pueden ser necesarios dos o más
55 ARN o proteínas para dicho rasgo. En este caso, puede ser suficiente controlar la expresión de únicamente un ARN o proteína como se describe en este documento. No obstante, es ambientalmente más seguro controlar la totalidad de los ARN o proteínas que producen un rasgo por el proceso de la invención (véase el ejemplo 1, Figura 5).

60 La invención también permite ensamblar una secuencia que codifica una proteína con módulos de, por ejemplo, péptidos señal, dominios de unión, señales de retención, señales de compartimentación, dominios de activación, dominios con actividades enzimáticas, etiquetas de afinidad y secuencias reguladoras. Un enfoque modular de este tipo hace que sea sencillo encontrar un casete de expresión óptimo para un propósito específico o para encontrar un péptido secretor o de tránsito óptimo para un gen específico que se va a sobreexpresar y acumular en la célula o en un compartimiento específico de la misma. Puede ser una herramienta útil para estudios genómicos y proteómicos funcionales. Se puede generar, por ejemplo, una biblioteca de plantas en donde cada miembro de la biblioteca contenga un módulo particular (por ejemplo, un péptido señal específico) de una de las clases de módulos anteriores, por ejemplo, como
65 dicho primer fragmento. El segundo fragmento después codificará una proteína de interés. Después de dicha hibrida-

ción (proceso (i)) o dicha introducción (proceso (ii)), la secuencia de ARN codificante de la proteína se une a dicho módulo por empalme *trans*. Se prefiere llevar a cabo este enfoque modular con el proceso (ii) de la invención y sin la integración estable de dicha segunda secuencia heteróloga en un cromosoma.

En esta invención, un rasgo también se puede expresar en un organismo multicelular transgénico mediante regulación a la baja de un gen nativo para dicho organismo. Un gen se puede regular a la baja mediante cualquiera de los métodos conocidos, por ejemplo por tecnología antisentido o por los ARN de interferencia pequeños (siARN). En tales realizaciones de la invención, el producto de la reacción de empalme *trans* proporciona un ARN antisentido o un siARN, opcionalmente después de procesamiento adicional como empalme *cis*. Se puede producir un siARN en el organismo transgénico al diseñar dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas de manera que el producto del empalme *trans* comprenda porciones de secuencia que tienen autocomplementariedad para formar una estructura de ARN bicatenario. Dicha estructura de ARN bicatenario puede tener una porción de identidad de secuencia a un gen de la célula hospedadora y puede tener una longitud suficiente para inhibir la expresión de dicho gen en dicha célula. Este método es particularmente útil para estudios genómicos funcionales, en particular en combinación con el segundo proceso de la invención. El método de inhibición genética por ARN bicatenario se describe de manera general en el documento WO 99/32619. Un método eficaz para regular a la baja cualquier gen diana deseado usando ARN de interferencia pequeños se describe en Brummelkamp *et al.* (Science 296, 550-553). Estos métodos se pueden combinar fácilmente con los procesos de la invención.

La aplicación más importante del proceso (i) es la producción de semillas híbridas para generar plantas para propósitos de agricultura o para la producción de una proteína en dichas plantas, por lo que dichas plantas tienen una distribución controlada de un rasgo a la descendencia. Dichas semillas híbridas permiten la generación de plantas que expresan un rasgo de interés que no se expresa en una línea de origen y que se segrega rápidamente en la descendencia.

La aplicación más importante del proceso (ii) es el control de expresión de un rasgo de interés. La expresión de dicho rasgo se puede activar al introducir dicha segunda secuencia de ADN heteróloga. Si dicha segunda secuencia de ADN heteróloga se incorpora dentro de un cromosoma nuclear, el mismo nivel de control de distribución de dicho rasgo es asequible como en el proceso (i). Si dicha segunda secuencia de ADN heteróloga no se incorpora en un cromosoma nuclear, la distribución de dicho rasgo incluso se controla adicionalmente, dado que la transferencia de dicho rasgo a la descendencia es extremadamente improbable.

La invención proporciona adicionalmente un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés, teniendo dicho organismo una distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia, en donde la expresión de dicho rasgo involucra la producción de una molécula de ARN por empalme *trans* de fragmentos de ARN, por lo que los fragmentos de ARN están codificados o están localizados en moléculas de nucleótidos heterólogas diferentes. Dichas moléculas de nucleótidos heterólogas diferentes pueden estar en cromosomas diferentes. Preferiblemente, dichos fragmentos de ARN están codificados en cromosomas alélicos. De manera más preferible, dichos fragmentos de ARN codifican, después de empalme *trans*, una proteína heteróloga.

La invención comprende adicionalmente partes o productos de los organismos transgénicos de la invención y semillas de plantas obtenidos mediante dicha hibridación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Esquema general de empalme *trans* mediado por ribozima que da como resultado la formación de ARNm funcional.

Figura 2

A - representa el principio general de la invención, en donde la formación mediada por empalme *trans* de transcritos funcionales se lleva a cabo en células de descendencia híbrida;

B - representa cuatro posibles ubicaciones relativas de la primera y segunda secuencias de ADN heterólogas en cromosomas hospedadores del organismo multicelular transgénico de la invención. Se usa como un ejemplo un organismo diploide que tiene dos cromosomas y un rasgo de interés codificado por dos fragmentos (A y B).

C - representa el principio básico de obtener las ubicaciones alélicas de dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN heterólogas que se proporcionan para empalme *trans*.

Figura 3

Esquema de un proceso, en donde el empalme *trans* seguido por el empalme *cis* lleva al ensamblaje de un gen funcional de interés (GOI) en una célula vegetal.

Figura 4

Esquema general del principio modular, en donde el empalme *trans* fusiona un péptido señal de elección con genes diferentes de elección, lo que permite compartimentar productos de genes diferentes en descendencia híbrida.

Figura 5

Esquema de un proceso, en donde el empalme *trans* genera la formación de transcritos que proporcionan rasgos de resistencia a insectos y a herbicidas. Rz significa ribozima.

Figura 6

Esquema detallado de interacción de ARN complementario para empalme *trans* mediado por ribozima de fragmentos del gen BAR.

La Figura 7 representa el vector binario pICBV19.

Descripción detallada de la invención

En esta invención, se propone dividir la secuencia codificante de un transgen involucrado en la expresión de un rasgo en dos o más fragmentos capaces de empalme *trans* a nivel de ARN, e introducir estos fragmentos en cromosomas diferentes del genoma hospedador, preferiblemente en cromosomas alélicos, de un organismo multicelular transgénico. Una vez transcritos, estos fragmentos se pueden ensamblar por empalme *trans* de ARN y de esta manera formar un ARN funcional, en particular ARNm, el cual puede proporcionar el rasgo de interés. Dado que el proceso de reproducción habitualmente involucra cruces parentales muy específicos, la administración de tales sistemas de dos alelos no genera problemas adicionales graves. Cualquier cruce espontáneo no deseado entre el organismo transgénico (en particular un organismo vegetal) de la invención y organismos no deseados desarma eficazmente dicho rasgo, suprimiendo de ese modo la expresión y reduciendo en gran medida la probabilidad de transferencia de un gen funcional a descendencia ilegítima.

El proceso de la invención permite construir mecanismos, que pueden controlar ya sea la expresión del transgen por sí mismo o que se pueden usar para controlar la variedad transgénica, dado que la descendencia de cualquier cruce ilegítimo se vuelve no viable. Estas dos posibilidades se contemplan, entre otras, en la invención.

El sistema de esta invención también permite a un especialista en la técnica diseñar esquemas para seleccionar transformantes primarios basándose en un marcador seleccionable que es eficaz y funcional en la descendencia T₀ pero cuyos alelos, tras cruces posteriores, se segregan a descendencia transgénica diferente y, de ese modo, desaparecen como un gen seleccionable funcional.

Además, la invención permite el ensamblaje rápido *in vivo* de diferentes genes cruzando padres que contengan fragmentos diferentes de una unidad transcripcional de interés, permitiendo de esta manera intercambiar dominios funcionales diferentes, tales como mejoradores traduccionales, péptidos de tránsito o señal o de dirección, etiquetas de purificación, diferentes dominios funcionales de proteínas, etc., simplemente cruzando plantas que porten los fragmentos deseados de una unidad de gen/transcripcional funcional de este tipo.

El empalme *trans* de ARN se puede obtener mediante la utilización de ribozimas sometidas a ingeniería genética. Una de las aplicaciones iniciales del fenómeno de empalme *trans* fue propuesto por Sullenger y Cech (*Nature*, 1994 371, 619-622) quienes describieron experimentos en los cuales se usa el empalme *trans* mediado por ribozimas, para reemplazar una porción defectuosa de ARN con una estructura funcional mediante la utilización del intrón de *Tetrahymena* grupo I sometido a reingeniería para generar transcritos lacZ traducibles en *E. coli*. Proponen el empalme *trans* como un medio general para alterar la secuencia de transcritos hospedadores específicos para propósitos de tratamiento de muchas enfermedades genéticas.

Ayre y colaboradores (1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3507-3512) proponen otro uso del empalme *trans*, quienes desarrollaron una tecnología que usa empalme *trans* mediado por ribozimas para dirigir citotoxinas al interior de células de una manera altamente específica. Usaron intrones de grupo I para empalmar el ARNm de la toxina A de Difteria con ARNm de virus para inactivar células que expresan ARNm viral y, de esta manera, inactivar selectivamente células de levadura infectadas. En la Figura 1 se muestra el principio general del empalme *trans* mediado por ribozima obtenido de intrón de grupo I.

Otra aplicación importante adicional se desarrolló por Mikheeva y Jarrell (1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7486-7490) quienes utilizaron intrones de grupo II sometidos a ingeniería genética para catalizar el ensamblaje de genes quiméricos. En esta investigación, se modificó la ribozima para redistribuir el ARNm del activador de plasmínógeno tisular y el ARN quimérico resultante se sometió a transcripción inversa en ADN. El enfoque permite crear unidireccionalmente bibliotecas de genes que codifican proteínas quiméricas con funciones novedosas.

Hasta nuestro mejor conocimiento, no existe técnica anterior que describa el uso del empalme *trans* mediado por ribozimas para ensamblar rasgos útiles en células vegetales de una manera biológicamente segura y controlable. El esquema general del empalme *trans* que media el ensamblaje de rasgo en la descendencia F_1 se muestra en la Figura 2A. Ninguna de las dos líneas parentales (P_1 y P_2) tiene un gen lineal completamente funcional que codifique dicho rasgo. Por el contrario, cada uno contiene fragmentos (A o B) del gen que se localizan preferiblemente en cromosomas alélicos. Como un resultado de la polinización entre P_1 y P_2 , se genera una descendencia con un rasgo funcional, por medio del ensamblaje mediado por empalme *trans* de los fragmentos A y B. Es evidente a partir de dicha Figura, que únicamente un cuarto de la descendencia S_1 obtenida de la autopolinización del híbrido primario conservará el rasgo de interés, mientras la otra mitad heredará sólo uno de los dos fragmentos necesarios para proporcionar dicho rasgo y un cuarto no tendrá A ni B. También es evidente que la polinización cruzada con cualquier otra planta (cruce ilegítimo) que no tenga ninguno de los fragmentos A y B no conducirá a la transmisión de dicho rasgo, dado que sólo uno de los dos fragmentos necesarios para cada gen funcional es transmitido a cada planta de la descendencia.

Modificar por ingeniería genética ribozimas que son capaces de dirigir el ARN seleccionado no es una tarea común, dado que deben cumplirse requerimientos específicos para la estructura de ribozima. Esto puede comprometer la secuencia del producto sometido a empalme *trans* y alterar la selección del sitio de empalme. Para volver este enfoque más flexible, se puede someter a ingeniería genética un intrón que alberga el sitio de empalme *trans*. En esta realización, el empalme *trans* conducirá a la formación de un intrón funcional. Dicho intrón puede experimentar adicionalmente empalme *cis* y producir ARN funcional de un gen de interés (GOI) responsable de dicho rasgo de interés. En la Figura 3 se muestra el esquema general de este enfoque. Tal enfoque, que se somete a ensayo para cada ribozima específica, es muy útil para experimentos de intercambio de evolución/dominio dirigidos, dado que permite someter a ingeniería genética sitios de empalme *trans* universales.

El empalme *trans* de la invención no se limita al uso de intrones del grupo I y sus derivados. Existen diferentes grupos/clases de intrones clasificados de acuerdo con su organización interna y mecanismo de empalme. Los intrones nucleares tienen en común que tienen dinucleótidos GT-AG en los extremos 5' y 3' y que habitualmente requieren formación de espliceosomas para su empalme. Los intrones de grupo I y grupo II reciben su nombre por intrones que se encuentran en genes mitocondriales fúngicos diferentes. Los mismos se clasifican de acuerdo con su organización interna pero tienen en común la capacidad de autocatalizar su propio empalme.

Los intrones nucleares se cortan y empalman por medio de un mecanismo mediado por snRNP (mediado por espliceosoma). Existe bibliografía abundante que describe los mecanismos y diseño del empalme *cis* que incluyen empalme alternativo de genes nucleares en diferentes organismos eucariotas (para una revisión véase Adams *et al.*, 1996, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 331-339; Hastings & Krainer, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 302-309). El empalme *trans* que se presenta de manera natural con la implicación de un mecanismo mediado por snRNP se describe para una unión de ARN SL (líder empalmado) al extremo 5' de los ARNm en tripanosomas (Agabian, N., 1990, *Cell*, 61, 1157-1160; Luo *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 31947-31954) y *Caenorhabditis elegans* (Hirsh & Huang, 1990, *Mol. Biol. Rep.*, 14, 115). Estos ARN "líderes empalmados" pequeños consisten en un exón 5' fusionado a secuencias que se pueden sustituir funcionalmente por snARN U1 en extractos de empalme de snRNP de mamífero. Un empalme *trans* similar de ARN SL también se mostró en cordados. En el protocolado ascidia *Ciona intestinalis*, los ARNm de por lo menos siete géneros experimentan empalme *trans* con SLRNA (Vandenberghe *et al.*, 2001, *Genes Dev.*, 15: 294-303). El empalme *trans* de los ARNm también se ha demostrado en células de mamífero (Eul *et al.*, 1995, *EMBO J.*, 14, 3226-3235; Li *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 11060-11071; Caudevilla *et al.*, 2001, *FEBS Lett.*, 507, 269-279) y *Drosophila* (Dorn *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9724-9729). Un indicio temprano de que el empalme *trans* puede funcionar en la maduración de ARN nuclear vegetal provino del análisis del ARNm que codifica una proteína quinasa (SPK) específica de semilla, dependiente de calcio del arroz (Kawasaki *et al.*, 1999, *Plant J.*, 18, 625-632). La cartografía de un clon de ADNc para SPK indicó que la totalidad del ADNc se dividió en dos regiones diferentes, SPK-A y SPK-B, localizadas en cromosomas diferentes de arroz. Existen informes de grupos diferentes, los cuales demuestran claramente que el empalme *trans* se puede someter a ingeniería genética mediante la utilización del mecanismo mediado por espliceosoma (Puttaraju *et al.*, 1999, *Nature Biotech.*, 17, 246-252; Liu *et al.*, 2001, *Nature Biotech.*, 20, 47-52).

Los intrones de grupo I y grupo II tienen la capacidad de empalmarse a sí mismos fuera del pre-ARNm. Esta reacción puede llevarse a cabo *in vitro* por el ARN solo. A tales ARN con actividades catalíticas generalmente se les denomina ribozimas. En esta invención, el término ribozima se usa para denominar los ARN catalíticos capaces de realizar reacciones de empalme *trans* entre moléculas de ARN separadas. Los intrones tanto de grupo I como de grupo II son capaces de empalme *trans* en sistemas artificiales (Been *et al.*, 1986, *Cell*, 47, 207-216; Jacquier *et al.*, 1986, *Science*, 234, 1099-1194; Jarrell *et al.*, 1988, *Mol. Cell Biol.*, 8, 2361-2366). El empalme *trans* también se observó para intrones de grupo II en genes divididos de cloroplastos (Kohchi *et al.*, 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16, 10025-10036) y para un intrón de grupo I en un gen dividido artificialmente en *Escherichia coli* (Galloway-Salvo *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 211, 537-549). Los intrones de grupo I se descubrieron por primera vez en el ARNr de *Tetrahymena thermophila* (Cech, T.R., 1990, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 543-568). Los mismos requieren una U en la secuencia diana inmediatamente 5' del sitio de escisión y unen 4 a 6 nucleótidos en el lado 5' del sitio de escisión. Existen más de 75 miembros conocidos de este grupo hasta ahora. También se observaron en mitocondrias fúngicas y vegetales (Richard & Dujon, 1997, *curr. Genet.*, 32, 175-181; Cho *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14244-14249), cloroplastos (Turmel *et al.*, 1993, *J. Mol. Biol.*, 232, 446-46), fago T4 (Galloway *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 211, 537-549), algas verdiazules y otros organismos.

Existen varios enfoques desarrollados y ribozimas sometidas a ingeniería genética las cuales se pueden usar para llevar a la práctica esta invención (las referencias se mencionan anteriormente). Las mismas realmente abarcan el uso de todos los tipos conocidos de intrones con el fin de someter a ingeniería genética acontecimientos de empalme *trans* en células eucariotas. Además de ser utilizadas en esta invención, también son aplicables ribozimas sometidas a ingeniería genética en la base de intrones de *Tetrahymena* del grupo I (documento US 6.015.794; Ayre *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3507-3512), mediados por espliceosoma (Puttaraju *et al.*, 1999, *Nature Biotech.*, 17, 246-252; Liu *et al.*, 2001, *Nature Biotech.*, 20, 47-52; US 6.083.702) o empalme *trans* medido por intrón de grupo II (Mikheeva & Jarrell, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7886-7490; documento US 5.498.531).

Los procesos de la invención se pueden usar como una manera conveniente de ensamblar una secuencia y/o una unidad de expresión deseada a partir de diferentes partes en *trans*, usando como módulos o componentes básicos plantas transgénicas diferentes (véase la Figura 4). Su descendencia híbrida se puede colocar junto a módulos heredados de padres diferentes a través del empalme *trans* mediado por ribozimas sometidas ingeniería genética. Es posible formar un rasgo de interés al seleccionar un par apropiado de padres transgénicos que contengan los módulos requeridos, de una manera muy similar a la selección de un par apropiado de plantas parentales para producir semillas híbridas de alto valor en reproducción tradicional. Los ejemplos de tales módulos incluyen péptidos señal diferentes, dominios de unión, señales de retención, señales de compartimentación, dominios de activación, dominios con actividades enzimáticas, etiquetas de afinidad, secuencias reguladoras, diferentes genes de interés y partes de los mismos.

Un ejemplo de aplicación del empalme *trans* contemplado en esta invención es la formación de resistencia a herbicidas y resistencia a insectos mediante empalme *trans* a partir de precursores no funcionales. En los Ejemplos 1 y 2 se describe el diseño de un sistema para la formación mediada por ribozimas de los ARNm de BAR y CryIIIa en plantas. En el primer ejemplo se describe el diseño de dos construcciones que contienen dicho primero y dicho segundo fragmento de la invención de un sistema de empalme *trans* para cada gen de interés *in trans*. La formación de los rasgos que confieren resistencia a PPT (herbicida fosfinotricina) y resistencia a insectos se presenta exclusivamente en células vegetales que albergan los dos ADN-T que se muestran en la Figura 5.

La transformación conjunta de los dos ADN-T se puede seleccionar con facilidad usando medios que contienen PPT. El análisis de enlace de ADN-T se describe en el Ejemplo 2, que permite seleccionar el transformante más apropiado que contenga los ADN-T diferentes en cromosomas alélicos diferentes, por ejemplo, unidos en repulsión.

Se pueden usar estrategias diferentes para introducir secuencias de ADN heterólogas de interés en células, en particular en células vegetales. Un enfoque se basa en la generación de dos transformantes independientes, cada uno de los cuales contiene una de las dos secuencias de ADN heterólogas involucradas en el empalme *trans*. Estas secuencias se pueden unir mediante cruce sexual o hibridación de células somáticas a través de fusión de protoplastos (Melchers, G., 1976, *Basic Life Sci.*, 8: 455-467; Ratushnyak *et al.*, 1993, *Mol. Gen. Genet.*, 236: 427-432), proporcionando de esta manera un rasgo de interés en su descendencia. Como alternativa, dos secuencias de ADN heterólogas se pueden integrar de manera estable en la misma célula vegetal durante uno o dos acontecimientos de transformación independientes. En ambos casos, el análisis genético de las descendencias de tales plantas preferiblemente se realiza con el fin de determinar el enlace entre dichos fragmentos de ADN y para seleccionar la ubicación más preferible de dichos fragmentos en relación el uno con el otro. Si las secuencias de ADN heterólogas que contienen dichos fragmentos se introducen en plantas diferentes, físicamente no están unidas en una planta híbrida, sino que se localizan en cromosomas diferentes o alélicos (unidos en repulsión). Además, existe una probabilidad relativamente elevada de que dichos fragmentos se encuentren unidos físicamente (localizados en el mismo cromosoma) en caso de integración estable de dichos fragmentos en la misma planta.

En un caso, dichos dos fragmentos están unidos físicamente, por ejemplo, se localizan en el mismo cromosoma (Figura 2B, caso I). En este caso, los fragmentos se pueden segregar en descendencia debido a entrecruzamiento meiótico, proporcionando de esta manera mejor control sobre la expresión y el movimiento de rasgo en comparación con la técnica anterior, donde dicho rasgo está codificado por una secuencia continua.

En una realización preferida, dichos fragmentos no están unidos físicamente, por ejemplo, se localizan en dos cromosomas diferentes (no homólogos) (Figura 2B, caso II). En este caso, únicamente la mitad de la descendencia propia y un cuarto de la descendencia cruzada de la planta heterocigota de ambos fragmentos heredará el rasgo.

De manera más preferible, dichos fragmentos están en cromosomas alélicos diferentes (Figura 2B, caso III). Aquí, toda la descendencia propia heredará el rasgo, pero la descendencia que se produzca como resultado del cruce con plantas que no posean ninguno de dichos fragmentos no heredará ningún rasgo si se descuida o está ausente el entrecruzamiento meiótico. Sin embargo, la recombinación meiótica entre los dos cromosomas alélicos puede unir físicamente dichos fragmentos A y B. La frecuencia de tales acontecimientos de recombinación depende directamente de la distancia relativa entre dichos fragmentos en dos cromosomas alélicos.

Con el fin de suprimir el enlace físico de los fragmentos por recombinación meiótica, los fragmentos preferiblemente se colocan a una distancia relativa corta o, de manera más preferible, en el mismo locus en cromosomas alélicos diferentes (Figura 2B, caso IV) y de esta manera se minimiza la frecuencia de recombinación meiótica entre tales fragmentos prácticamente a cero. Existen diferentes soluciones técnicas para obtener la ubicación alélica más preferible de los fragmentos. Dichos fragmentos A y B se pueden integrar dentro del ADN cromosómico en una construcción AB (Figura 2C). El diseño de la construcción permitirá la remoción seleccionable de uno de los fragmentos de ADN

heterólogos (A o B) usando mecanismos de reordenamiento de ADN controlable (corte, inversión o transposición) generando de esta manera descendencia que contiene ya sea el fragmento A o el fragmento B en el mismo locus, o habiendo transcrito selectivamente ya sea el fragmento A o el fragmento B sin necesidad de retirarlos. Unir ambos fragmentos o sus transcritos por cruce de plantas que poseen únicamente uno de dichos fragmentos o ambos fragmentos, pero únicamente uno de los transcritos requeridos, generará la expresión de un rasgo de interés. Un ejemplo de recombinación de ADN controlada puede ser flanquear los fragmentos A y B con secuencias reconocidas por recombinasas diferentes específicas de sitio y, tras tal reconocimiento, separar selectivamente ya sea el fragmento A o el fragmento B. De manera alternativa, ambos fragmentos se pueden flanquear por secuencias para recombinación específica de sitio en tal orientación, de manera que la exposición a la fuente de recombinasa que reconoce dichas secuencias llevará a la inversión del fragmento de ADN con ambos fragmentos. La colocación de la región de inicio de transcripción (promotora) justo fuera de dicho fragmento de ADN puede generar la transcripción del fragmento A o B, dependiendo de la orientación de los fragmentos. Otro enfoque comprende el uso de la transposición en donde, por ejemplo, el fragmento B se localiza y transcribe dentro de un elemento susceptible de transposición no autónomo, pero su corte de la construcción activará la transcripción del fragmento A. El corte del transposón no necesariamente genera su inserción en otra parte, de manera que la descendencia se puede seleccionar para que contenga únicamente el fragmento A.

En los ejemplos, se usó el suministro de ADN-T mediado por *Agrobacterium* en células vegetales, en donde dicho ADN-T contiene dicha primera o dicha segunda secuencias heterólogas como un vector. Se pueden usar métodos diferentes para el suministro de vectores al interior de células vegetales tales como introducción directa del vector en las células por medio de bombardeo con microproyectiles, electroporación o transformación de protoplastos mediada por PEG. Se prefiere la transformación de planta mediada por *Agrobacterium*, en particular para el proceso (i) y para dicha primera secuencia heteróloga del proceso (ii). De esta manera, el ADN se puede transformar en células vegetales por diversas tecnologías adecuadas tales como mediante el vector del plásmido Ti transportado por *Agrobacterium* (documentos US 5.591.616; 4.940.838 y 5.464.763), bombardeo con partículas o microproyectiles (documentos US 05100792; EP 00444882B1 y EP 00434616B1). En principio, también se pueden usar otros métodos de transformación de plantas, por ejemplo microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1 y EP 175966B1), electroporación (documentos EP00564595B1; EP00290395B1 y WO 08706614A1), etc. La selección del método de transformación depende de la especie vegetal que se va a transformar. Por ejemplo, se puede preferir el bombardeo con microproyectiles para transformación de monocotiledonias, mientras que para dicotiledonias generalmente se obtienen mejores resultados con la transformación mediada por *Agrobacterium*.

El sistema de empalme *trans* descrito en la invención consiste en dos o más fragmentos los cuales se proporcionan en *trans*. Esto significa que este sistema está mejor controlado y es más seguro, por ejemplo, puede tener un nivel de expresión cero en estado no inducido.

Los genes de interés o fragmentos de los mismos, que se pueden expresar, en orientación sentido o antisentido usando esta invención incluyen; enzimas modificadoras de almidón (almidón sintetasa, enzima de fosforilación de almidón, enzima de desramificación, enzima de ramificación de almidón, enzima II de ramificación de almidón y almidón sintetasa unida a gránulos), sacarosa fosfato sintetasa, sacarosa fosforilasa, poligalacturonasa, polifrutano sacarasa, ADP glucosa pirofosforilasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, fructosiltransferasa, glucógeno sintetasa, pectina esterasa, aprotinina, avidina, levansacarasa bacteriana, proteína gIgA de *E. coli*, MAPK4 y ortólogos, enzima de asimilación/metabolismo de nitrógeno, glutamina sintetasa, osmotina vegetal, albúmina 2S, taumatina, recombinasa/integrasa específica de sitio (FLP, Cre, recombinasa R, Int, SSVI Integrasa R, Integrasa phiC31 o un fragmento activo o variante de las mismas), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de soja), toxina de tipo de coleóptero o un fragmento con actividad insecticida, proteínas de fusión de enzima de conjugación de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, superóxido dismutasa, forma de proenzima inactiva de una proteasa, toxinas de proteínas vegetales, rasgos que alteran las fibras en plantas productoras de fibras, toxina activa de coleóptero de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt2, proteína cristalina insecticida (ICP), toxina CryIC, endotoxina delta, toxina polipeptídica, protoxina, etc.), toxina específica de insecto AaIT, enzimas de degradación de celulosa, celulasa E1 de *Acidotherrmus celluloticus*, enzimas modificadoras de lignina, cinamoil alcohol deshidrogenasa, trehalosa-6-fosfato sintetasa, enzimas de la ruta metabólica de citoquinas, HMG-CoA reductasa, pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, proteína de almacenamiento de semillas, licopeno sintetasa de *Erwinia herbicola*, ACC oxidasa, proteína codificada por pTOM36, fitasa, cetohidrolasa, acetoacetil CoA reductasa, PHB (polihidroxibutanoato) sintetasa, proteína transportadora de acilo, napina, EA9, fitoeno sintetasa de plantas no superiores, proteína codificada por pTOM5, ETR (receptor de etileno), piruvato fosfato diquinasa plastídica, proteína de poros transmembrana inducible por nemátodos, rasgo que incrementa la función fotosintética o de plástidos de la célula vegetal, estilbeno sintetasa, una enzima capaz de hidroxilar fenoles, catecol dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, antranilato sintetasa, proteína AGL15 de *Brassica*, fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), AMV RNA3, PVY replicasa, PLRV replicasa, proteína de cubierta de potyvirus, proteína de cubierta de CMV, proteína de cubierta de TMV, replicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa geminiviral mutante, *Umbellularia californica* C12:0 que prefiere acil-ACP tioesterasa, planta C10 o C12:0 que prefiere acil-ACP tioesterasa, C14:0 que prefiere acil-ACP tioesterasa (luxD), factor A de sintetasa vegetal, factor B de sintetasa vegetal, 6-desaturasa, proteína que tiene una actividad enzimática en la oxidación peroxisómica de ácidos grasos en células vegetales, acil-CoA oxidasa, 3-cetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA-carboxilasa de maíz, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP), fosfinotricina acetil transferasa (BAR, PAT), proteína CP4, ACC desaminasa, ribozima, proteína que tiene un sitio de escisión postraducciona, proteína de fusión que consiste en un dominio de unión de ADN del activador transcripcional Gal4 y un dominio de activación transcripcional, una fusión traducciona de proteína oleosina con proteína de interés capaz de dirigir la proteína de fusión en la fase lipídica, gen DHPS que confiere resistencia a sulfonamida, nitrilasa bacteriana, 2,4-D monooxigena-

sa, acetolactato sintetasa o acetohidroxiácido sintetasa (ALS; AHAS), poligalacturonasa, nitrilasa bacteriana, fusión de la región hidrófoba amino terminal de una proteína translocadora de fosfato madura que reside en la envuelta interior de membrana de un plástido con proteína de interés para dirigirse al interior de dicha membrana, etcétera.

- 5 Cualquier proteína humana o animal se puede expresar usando el sistema de empalme *trans*. Los ejemplos de tales proteínas de interés incluyen, entre otros, proteínas de respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, receptores de células T, etcétera), antígenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas, citoquinas y sus receptores, interferones, factores de crecimiento y factores de coagulación, enzimas lisosómicas enzimáticamente activas, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación sanguínea, tripsinógeno, 1-
10 antitripsina (AAT), así como proteínas conservadoras de función como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas anteriores.

- El proceso de la invención puede comprender adicionalmente la expresión de un gen que codifique una proteína supresora de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) o una variante conservadora de función o un fragmento
15 de la misma en una planta para suprimir PTGS de dicha secuencia codificante transgénica. Dicho gen de proteína supresora PTGS o variante conservadora de fusión o fragmento del mismo se puede proporcionar a una planta en el mismo vector que porta dicha secuencia codificante transgénica o en un vector adicional. Dicha proteína supresora PTGS preferiblemente es de origen viral o vegetal. Los ejemplos de proteínas supresoras PTGS son la proteína X p25 del virus de patata, la proteína AC2 del virus del mosaico de cassava africana, la proteína P1 del virus moteado amarillo del arroz, la proteína 19K del virus del enanismo ramificado del tomate, rgs CAM o una variante conservadora
20 de fusión o un fragmento de una de estas proteínas. Dicha variante conservadora de función o fragmento preferiblemente tiene una identidad de secuencia del 75% para una de las proteínas anteriores. Los detalles sobre las proteínas supresoras PTGS y su uso se pueden encontrar en el documento WO0138512.

- Esta invención también es aplicable para genes marcadores seleccionables/calificables y sus fusiones con diferentes genes de interés permitiendo de ese modo la selección directa del mejor productor de proteína recombinante. Los
25 ejemplos de tales marcadores seleccionables/calificables incluyen, por ejemplo, genes o fragmentos de: neomicina fosfotransferasa II (NPTII), higromicina fosfotransferasa, aminoglucósido de 6'-N-acetiltransferasa, 5-enolpiruvil-hikimato-3-fosfato sintetasa, fosfinotricina acetil transferasa (BAR), betaina aldehído deshidrogenasa (BADH), dihidrofolato reductasa (DFR1), 6' gentamicina acetiltransferasa (6' GAT), acetolactato sintetasa (ALS), fosfomanosa-isomerasa (PMI), glifosato óxidorreductasa, acetohidroxiácido sintetasa (AHAS), 2-desoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa (2-DOG-6-P), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP) y fusiones de genes marcadores seleccionables y susceptibles de cribado.

35 Ejemplo 1

Diseño de construcción para ensamblaje de transcrito de BAR y CryIIIA mediado por empalme trans

- Se diseñaron dos construcciones de ADN-T (véase la Figura 5), una con ribozima unida al extremo 3' del gen
40 BAR (Acceso de Gene Bank X17220) y el extremo 5' del gen CryIIIA (Acceso de Gene Bank X70979) y otro - con el extremo 5' del gen BAR y unido a ribozima con el extremo 3' del gen CryIIIA, usando técnicas de biología molecular convencionales (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY, 2ª edición). La primera construcción (Figura 5, parte superior) porta el extremo 5' de una unidad transcripcional impulsada por promotor 35S que contiene un gen CryIIIA unido al fragmento de 200 p.b. del
45 gen HPT en orientación sentido y una unidad transcripcional impulsada por el promotor nos que contiene un fragmento del gen HPT de 300 p.b. en orientación antisentido seguido por una ribozima unida al extremo 3' del gen BAR. La segunda construcción (Figura 5, segunda desde la parte superior) tiene un fragmento de gen HPT de 200 p.b. impulsado por el promotor 35S en orientación antisentido seguido por una ribozima unida al extremo 3' del gen CryIIIA y un extremo 5' impulsado por el promotor nos del gen BAR unido con un fragmento de HPT de 300 p.b. en orientación
50 sentido. Las presentaciones esquemáticas de las construcciones así como los productos de empalme *trans* se muestran en la Figura 5. La Figura 6 muestra una imagen detallada del proceso de empalme *trans* que produce un gen BAR funcional.

Clonación del extremo 5' del gen BAR del sistema de empalme trans

- 55 Una parte del gen HPT (300 nucleótidos, N° de Acceso de Gene Bank V014999, cuya secuencia se muestra más adelante) se seleccionó como la secuencia diana. HPT es un gen bacteriano, no está relacionado con ninguno de los genes vegetales. El contenido de G/C es de aproximadamente el 60%, de manera que el apareamiento de bases entre las partes 5' y 3' del vector viral debe ser muy eficaz:

- 65
attgtgatcccatgtgtatcactggcaactgtgatggacgacaccgtcagtgctccgtcgcgcaggcctcgtatgagctgat
gctttgggcccaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggattcggctccaacaatgtcctgacggacaatggcc
gcataacagcggtcattgactggagcggagcgalgttcggggattcccaatacggaggtcgccaacatcctcttcggaggccgt
ggttggctgtatggagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcat

ES 2 329 450 T3

Se usaron los siguientes cebadores para la amplificación de la secuencia diana de HPT de 300 pb: (los sitios de restricción se escriben con negritas y están subrayados):

Targhpt1:

5'-**atgcctcgag**ttactagaattgctgatccccatgtgtatcac-3'

XhoI

Targhpt3:

5'-tcagg**tcgac**atgcctccgctcgaagtagcgcg-3'

Sall

Targhpt4:

5'-tgact**ctaga**attgctgatccccatgtgtatcac-3'

XbaI

Targhpt5:

5'-tcagg**gtacc**atgcctccgctcgaagtagcgcg-3'

KpnI

La secuencia codificante del gen BAR se dividió en dos partes en la parte media del dominio de acetiltransferasa (restos de AA 60-142) para asegurar que no hay resistencia a fosfotricina proporcionada por cualquiera de las partes separadas. Los cebadores usados para PCR de los fragmentos de interés son:

Pnos1:

5'-**ctagaattcatgagcggagaattaagggagtc**-3'

EcoRI

Bar1r:

5'-**gtaactcgagtgacttcagcaggtgggtgtag**-3'

XhoI

El extremo 5' del gen BAR junto con el promotor nos se amplifica por PCR usando ADN plasmídico de pICBV19 (Figura 7) como molde y los cebadores pnos1 y bar1r. Este fragmento de PCR se digirió con XhoI y EcoRI y se clonó en un fragmento grande de pICBV19 binario digerido con KpnI-EcoRI junto con targhpt1-targhpt5 amplificado y digerido con el fragmento HPT de enzimas de restricción KpnI y XhoI. Esto produjo pICBV19 que contenía el extremo 5' del gen BAR unido a 300 pb de la secuencia codificante de HPT bajo el control del promotor NOS (construcción intermediaria 1).

La construcción pICH1600, que contiene el gen HPT, se tomó como molde para amplificación por PCR de los fragmentos de HPT.

Clonación de extremo 3' del gen BAR del sistema de empalme *trans*

Para clonación del extremo 3' del gen BAR unido con ribozima, el fragmento Kpn 1 - EcoR 1 de pICBV19 (pNOS-BAR) se reemplazó con el promotor pNOS separado de la señal de terminación de transcripción de OCS 3' por los sitios de restricción SalI y Nco I.

ES 2 329 450 T3

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar el extremo 3' del gen BAR:

Bar2f:

5'-ggagaagcttggcttcaagagcgtggctg-3';

HindIII

Bar3r:

5'-catgccatggtcaaattcgggtgacgggcaggacc-3'.

NcoI

La secuencia de la ribozima sintética basada en el intrón de grupo I se tomó del ARNr 26S precursor de *Tetrahymena thermophila* (Koehler *et al.*, 1999, J. Mol. Biol., 285, 1935-1950; Ayre *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 96, 3507-3512).

XbaI

tctagacttatcggtgacaaaagttaacagcatgcacctgtagctagtcttaaaccaatagattgcacggtttaaaaggca
agaccgtcaaatgcgggaaggggtcaacagccgttcagtaccaagctcaggggaaacttgagatggccttgcaaagggg
atggtataagctgacggacatggtcctaaccaagcagccaagtcctaagtcacagatcttctgtgatggatgcagttcaca
gactaaatgcggtcggggaagatgtattcttcataagatatagtcggacctctcctaattgggagctagcggatgaagtatgc
aacactggagccgctgggaactaattgtatgcgaaagtatattgattagtttggagtactcgtgataagctt

HindIII

Esta secuencia de ribozima se adquirió en ATG:Biosynthetics GmbH (P0202001), insertada en pBluescript II SK(+) entre los sitios de restricción HindIII y XbaI (plásmido pICH080) y se usó para etapas de clonación adicionales. Después, la ribozima de pICH080 se fusionó a la versión antisentido del HPT diana (fragmentos PCR de XbaI/SalI de 300 pb (amplificado con cebadores Targhpt3 y Targhpt4) para obtener el plásmido intermediario basado en pBS(KS+). Este plásmido se usó para aislar un fragmento Hind III/Sal I de ribozima unido con fragmento de HPT de 300 pb en orientación antisentido.

La etapa final en la clonación de este casete de expresión incluyó el ligamiento de tres vías del fragmento de ribozima -HPT Hind III/SalI con un fragmento de PCR tratado con HindIII/NcoI (cebadores bar2f y bar3r) del extremo 3' del gen BAR y un vector binario modificado digerido con NcoI/SalI pICBV19 (Figura 7). La clonación final produjo pICBV19 que contenía una ribozima unida al extremo 3' del gen BAR bajo el control del promotor NOS (construcción intermediaria 2).

El proceso de clonación del gen BAR en dos fragmentos y su ensamblaje mediante empalme *trans* condujo a la sustitución neutra de tres restos aminoacídicos no conservados en la región de división (Glu-Asp; Ala-Lys; Gln - Leu).

Clonación del extremo 5' del gen CryIIIA del sistema de empalme *trans*

Se seleccionó una parte del gen HPT (180 nucleótidos, N° de Acceso de Gene Bank V014999, la secuencia se muestra más adelante) como la secuencia diana en este caso.

5'-ctgaactcac cgcgacgtct gtcgagaagt ttctgatcga aaagttcgac agcgtctccg acctgatgca gctctoggag
ggcgaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatgggtt
ctacaaagat cggtatgttt-3'

Esta secuencia no se solapa con el fragmento de HPT de 300 p.b. usado para diseñar el sistema de empalme *trans* mediado por ribozima para el gen BAR.

ES 2 329 450 T3

Para clonación con el extremo 5' del gen CryIIIA, el fragmento de HPT de 180 p.b. se amplificó con los cebadores hpt1f (5'-gc**atctcgag** ttactagct gaactcaccg cgacgtct gtc-3') y hpt2r (5'-ctgc**ggatc** caaacataac gatctttag aaaccatcc-3'), se digirió con XhoI y BamH1 y se ligó junto con un fragmento sintético ClaI/XhoI del gen CryIIIA (ATG:Biosynthetics GmbH) en un fragmento ClaI/BamH1 purificado en gel de la construcción intermediaria 2. Los sitios de restricción para XhoI y BamH1 en las secuencias del cebador se muestran con negritas. La construcción final se muestra en la Figura 5 (parte superior).

El fragmento 5' del gen CryIIIA sintético con el extremo 5' del intrón de actina 1 de arroz (que se muestra en cursivas, Gene Bank N° de acceso X63830) flanqueado por los sitios de restricción ClaI (extremo 5') y XhoI (extremo 3'):

ClaI

5'-**atcg** atgactgcag acaacaacac cgaagccctc gacagttcta ccactaagga tgttatccag aagggtatct
cgttgttggg agacctcttg ggcgtggttg gatttccctt cggiggagcc ctctgtagct tctatacaaa ctttctcaac
accatttggc caagcgagga cccttgaaa gcatctatgg agcaagtga agctctatg gatcagaaga ttgcagatta
tgccaagaac aaggcttttg cagaactcca gggccttcag aacaigtgg aggactacgt gagtgcattg tccagctggc
agaagaaccc tgttagctcc agaaatctc acagccaagg taggatcaga gatttgttct ctcaagccga atcccacttc
agaaattcca tgcttagctt tgctatctc ggttacgagg ttcttttctt cactacctat gdtcaagctg ccaacaccca
ctgtttctc cttaaggacg ctcaaatcta tggagaagag tggggatagc agaaagagga cattgtgag ttctacaagc
gtcaactta gctacccaa gactacatg accattgctt gaaatggat aacgttggc tcgataagc: cagaggctct
tcctacgagt ctgggtgaa ctcaacaga tacaggagag agatgacctt gactgtgctc gatcttaicg cactcttcc
ctgtacgat gtgagactct acccaaagga agtgaaaact gagcttacca gagacgtgct cactgacctt attgtcggag
tcaacaacct taggggttat ggaactacct

EcoR1

tcagcaatat cgaaaactac attaggaaac cacatctctt cgactatctt cacagaattc aattccacac aag
gtaaccaccc cgcgtccctc tctctttct ttctccgttt ttttttccg tctcgtctcg atcttggcc ttggtagttt gggggcgaga
ggcggcttcg tgcgccagat cgggtgcgcg gggggcgagg

BamH1

atctcgcggc tgggtctcgg cgtgcggccg **gattcctcgcg** gggaatggg ctctcggatg tagatctgat cgcgcgttgt
tgggggagat gatggggcgt ttaaaatttc aagtcactcg **ag-3'**

XhoI

ES 2 329 450 T3

El fragmento 3' del gen CryIIIA sintético precedido por el extremo 3' del intrón de actina 1 de arroz (mostrado en cursivas) y flanqueado por los sitios de restricción HindIII (extremo 5') y BamHI (extremo 3'):

```

5      HindIII
      5'aagctt gccatgctaa acaagatcag gaagagggga aaagggcact atgggttata ttttatata ttctgctgc
      tgcctgcag gcttagatgt gctagatctt tcttctctt ttttggggt agaattgaatccctcagca ttgttcacg gtagttttc
10     tttcatgat ttgtgacaaa tgcagcctcg tgcggagctt tttgtag gttcaa ccaggatact atggtaacga ctcttcaac
      tattgggccg gtaactatgt ttccaccaga ccaagcattg gatcaatga catcatcaca tctccctct atggtaacaa
      gtccagttaa cctgtgcaga acctgaggtt caacggcgag aaagtctata gagccgtcgc aaacaccaat ctgctgtgt
15     ggccatccgc agtttactca ggctgcacaa aggtggaggt tagtcagtat aacgatcaga ccgatgaggc cagcaccag
      acttacgact ccaaacgtaa cgttggcgca gtctctggg attctatcga ccaattgcct ccagaaacca cagacgaacc
      atggagaag ggctacagcc accaacttaa ctatgtgatg tgctcttga tgcaagggtc cagagggacc attccaggt
20     tgacctggac acacaagtcc gtggactct tcaacatgat cgatagcaag
      aagatcactc aacttccctt ggtgaaagcc tacaagctgc aatctgggtc ttccgtgtc
      gcaggtccca gattcactgg aggtgacatc atccagtga cagagaacgg cagcgcagct
25     actatctacg tgacacctga tgtgtctac tctcagaagt acagggcacg taticattac

30     gcattacca gccagatcac ctacacactc agcttggatg gagcaccctt caaccagtat
      tactttgaca agaccatcaa caaagggtgac actctcacat acaatagctt caacttggca
35     agtttcagca caccattga actctcaggc aacaatcttc agatcggcgt caccggcttc
      agcgcgggag acaaagtcta catcgacaag attgagttca tccagtga ctaggatcc

                                     BamHI

```

La región entre los dos bloques conservados (bloque 2 y bloque 3) dentro del dominio II se seleccionó para la división de CryIIIA en dos partes (Schnepf *et al.*, 1998, *Microbiol & Mol. Biol. Rev.*, 62, 775-806).

45 *Clonación del extremo 3' del gen CryIIIA del sistema de empalme trans*

El fragmento Hind111/Xba1 de ribozima se clonó junto con un fragmento de HPT Sac1/Xba1 de 180 p.b. en los sitios Sac1/Hind 111 pBS(KS+), lo que genera un fragmento de ribozima unido con el fragmento de gen HPT en orientación antisentido. El fragmento de HPT se amplificó por PCR con los cebadores hpt3f (5'- gcatagatctct gaactaccg cgacgtct gtc-3') y hpt4r (5'-ctgcgagctcaaacataac gatctttag aaacctcc-3') usando el plásmido pICH1600 como el molde. El fragmento Hind111/BamHI sintetizado que contiene el extremo 3' del fragmento cryIIIA precedido por el extremo 3' del intrón del gen de actina 1 de arroz (véase anteriormente), se clonó junto con el fragmento Hind111/Sac1 de Ribozima-HPT dentro de los sitios Sac1/BamHI de la construcción intermediaria 1, reemplazando al gen GUS con la parte 3' unida a ribozima de CryIIIA y generando la construcción final (véase la Figura 5, segundo desde la parte superior).

Ejemplo 2

60 *Detección de acontecimientos de empalme trans en células vegetales transformadas*

Los ADN-T de construcciones mostrados en la Figura 5, se co-introdujeron en plantas *Arabidopsis thaliana* (Col-0) como se describe por Bent *et al.*, (1994, *Science*, 285, 1856-1860). Las semillas se cosecharon tres semanas después de infiltración al vacío y se germinaron y seleccionaron para detectar transformantes, pulverizándolas varias veces con 50 mg/l de solución de fosfinotricina (PPT). Las mismas construcciones se usaron también para co-transformación de disco de hoja mediado por *Agrobacterium* de plantas de *Nicotiana* (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231) usando 10 mg/l de PPT.

ES 2 329 450 T3

Las plantas transgénicas que muestran resistencia a PPT, albergan dos ADN-T diferentes, que portan las partes diferentes del gen BAR. Ninguna de las plantas resistentes a PPT se recuperó mediante la utilización de sólo una de las dos construcciones. Esto sugiere que CryIIIA también estará presente en la célula, dado que sus partes están unidas con fragmentos del gen BAR.

Se realizó análisis Southern para seleccionar transgénicos con una sola copia de cada ADN-T.

El análisis genético de las descendencias T_1 (autopolinizada a partir de T_0) y F_1 (T_0 X de tipo silvestre) de transformantes primarios (T_0) permite seleccionar plantas transgénicas que portan dos ADN-T funcionalmente complementarios en cromosomas iguales, diferentes o alélicos. Por ejemplo, T_1 que muestra la segregación $PPT^r:PPT^s = 3:1$ y F_1 que segrega $PPT^r:PPT^s = 1:1$, se refiere a que los ADN-T están unidos y se pueden segregar únicamente como resultado de un entrecruzamiento meiótico. El caso, en el que T_1 que muestra una segregación $PPT^r:PPT^s = 9:7$ y F_1 que se segrega como $PPT^r:PPT^s = 1:3$, se refiere a que los ADN-T se localizan en cromosomas no alélicos diferentes. La T_1 que muestra la segregación $PPT^r:PPT^s = 1:1$ y F_1 que segrega $PPT^r:PPT^s = 0:1$, se refiere a que los ADN-T se localizan en cromosomas alélicos. El último caso será preferible para trabajar, dado que la transferencia de los rasgos de resistencia a herbicidas y resistencia a insectos a través de la polinización cruzada será muy limitada.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés y que tiene una distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia, en el que dicho proceso comprende hibridar

un primer organismo vegetal multicelular o una célula del mismo que tiene una primera secuencia de ADN heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés, y

un segundo organismo vegetal multicelular o una célula del mismo que tiene una segunda secuencia de ADN heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés,

por lo que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se diseñan de manera que dicho rasgo de interés surja debido a empalme *trans* de ARN después de dicha hibridación, y

por medio del cual dicho primero y dicho segundo fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifican dicho rasgo de interés están presentes en cromosomas alélicos.

por medio del cual se excluyen procesos básicamente biológicos para la producción de plantas.

2. Un proceso para producir un organismo vegetal multicelular transgénico que exprese un rasgo de interés y que tenga una distribución controlada a la descendencia y de dicho rasgo, en el que dicho proceso comprende:

(a) incorporar una primera secuencia de ADN heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés en un organismo vegetal multicelular o una célula del mismo para obtener un primer organismo vegetal multicelular o una célula del mismo, y

(b) incorporar una segunda secuencia de ADN heteróloga que comprende un segundo fragmento de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés dentro de un organismo vegetal multicelular o una célula del mismo para obtener un segundo organismo vegetal multicelular o una célula del mismo, y

(c) hibridar dicho primer organismo vegetal multicelular o una célula del mismo y dicho segundo organismo vegetal multicelular o una célula del mismo;

por lo que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se diseñan de manera que dicho rasgo de interés surja debido al empalme *trans* de ARN después de dicha hibridación, y por lo que dicho primer y dicho segundo fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifican dicho rasgo de interés están presentes en cromosomas alélicos.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho medio de distribución controlada se refiere a que, tras el cruce de dicho organismo multicelular transgénico con un organismo carente de dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas, la frecuencia de aparición de dicho rasgo en los organismos que descienden del anterior es menor del 1%, preferiblemente menor del 0,1% y de manera más preferible menor del 0,01%, de manera más preferible menor del 0,001%.

4. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que al menos una de dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN heterólogas comprende una ribozima para empalme *trans*.

5. El proceso como de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la ribozima de empalme *trans* se selecciona entre el siguiente grupo: ribozimas derivadas de intrón de grupo I, ribozimas derivadas de intrón de grupo II y otras ribozimas diseñadas natural o artificialmente capaces de empalme *trans* de ARN específico.

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho empalme *trans* es mediado por un espliceosoma.

7. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho organismo vegetal multicelular transgénico es incapaz de expresar dicho rasgo de interés en ausencia de dicha primera o dicha segunda secuencias heterólogas.

8. El de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho empalme *trans* da como resultado ARN mensajero capaz de traducir y producir una proteína dotando de ese modo a dicho organismo vegetal multicelular transgénico con dicho rasgo de interés.

9. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho empalme *trans* da como resultado una pluralidad de ARN mensajeros expresables, generando de ese modo proteínas múltiples o proteínas quiméricas diferentes.
- 5 10. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho empalme *trans* da como resultado ARN bicatenario.
- 10 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho ARN bicatenario tiene una porción de secuencia idéntica a un gen diana suficientemente larga para inhibir la expresión de dicho gen diana en dicho organismo vegetal multicelular transgénico.
- 15 12. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que a dicho organismo multicelular se proporciona dicha primera o dicha segunda secuencia heteróloga por transfección viral, suministro mediado por *Agrobacterium*, suministro no biológico o por conversión de (a) una molécula o moléculas polinucleotídicas que se pre-integraron en un ADN nuclear o que se mantuvieron de manera autónoma en el núcleo, para formar dicha primera o dicha segunda secuencia heteróloga.
- 20 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende una transformación estable e integración estable de dicha primera o dicha segunda secuencia heteróloga en un cromosoma de dicho organismo multicelular.
- 25 14. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho primer o dicho segundo fragmento está unido operativamente a más de una ribozima de empalme *trans* o a 2 o más ribozimas de empalme *trans* diferentes.
- 30 15. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha primera o dicha segunda secuencia heteróloga contiene un intrón o una parte del mismo de manera que el producto de ARN de la reacción de empalme *trans* contiene un intrón capaz de empalme *cis*.
- 35 16. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho rasgo de interés está implicado en esterilidad masculina.
- 40 17. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho rasgo se selecciona del siguiente grupo: resistencia a herbicida, resistencia a insecticida, marcador seleccionable y marcador contra-seleccionable.
- 45 18. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la expresión de dicho rasgo de interés depende del procesamiento correcto de dicha primera o dicha segunda secuencia o secuencias heterólogas.
- 50 19. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas en dicho organismo vegetal multicelular transgénico se segregan como loci no relacionados.
- 55 20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dichos loci no relacionados se colocan de manera de minimizar la recombinación y creación de enlaces entre dichos loci.
- 60 21. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 20, en el que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas en dicho organismo vegetal multicelular transgénico se localizan en el mismo locus en dichos cromosomas alélicos.
- 65 22. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 21, en el que la reacción de empalme *trans* y la traducción del producto de dicha reacción de empalme *trans* genera una proteína que tiene un polipéptido unido a la misma mediante reacción de empalme *trans*, por lo que dicho polipéptido se selecciona del siguiente grupo: polipéptido de señalización, de dirección y de transducción de membrana; una etiqueta de reconocimiento y de purificación.
23. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dicho organismo multicelular transgénico es capaz de producir descendencia.
24. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 23, en el que dicho primer organismo multicelular se vuelve homocigoto con respecto a dicha primera secuencia de ADN heteróloga y dicho segundo organismo multicelular se vuelve homocigoto con respecto a dicha segunda secuencia de ADN heteróloga.
25. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 24, en el que dicho proceso se usa para producir semillas híbridas de dicha planta multicelular transgénica.
26. Un organismo vegetal multicelular transgénico que expresa un rasgo de interés, teniendo dicho organismo una distribución controlada de dicho rasgo a la descendencia, comprendiendo dicho organismo vegetal:
- (i) una primera secuencia de ADN heteróloga que comprende un primer fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés y

ES 2 329 450 T3

- (ii) una segunda secuencia de ADN heteróloga que comprende un segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés,

por lo que dicha primera y dicha segunda secuencias heterólogas se diseñan de manera que dicho rasgo de interés surja debido a empalme *trans* de ARN, y

por lo que dicho primer y dicho segundo fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica dicho rasgo de interés están presentes en cromosomas alélicos.

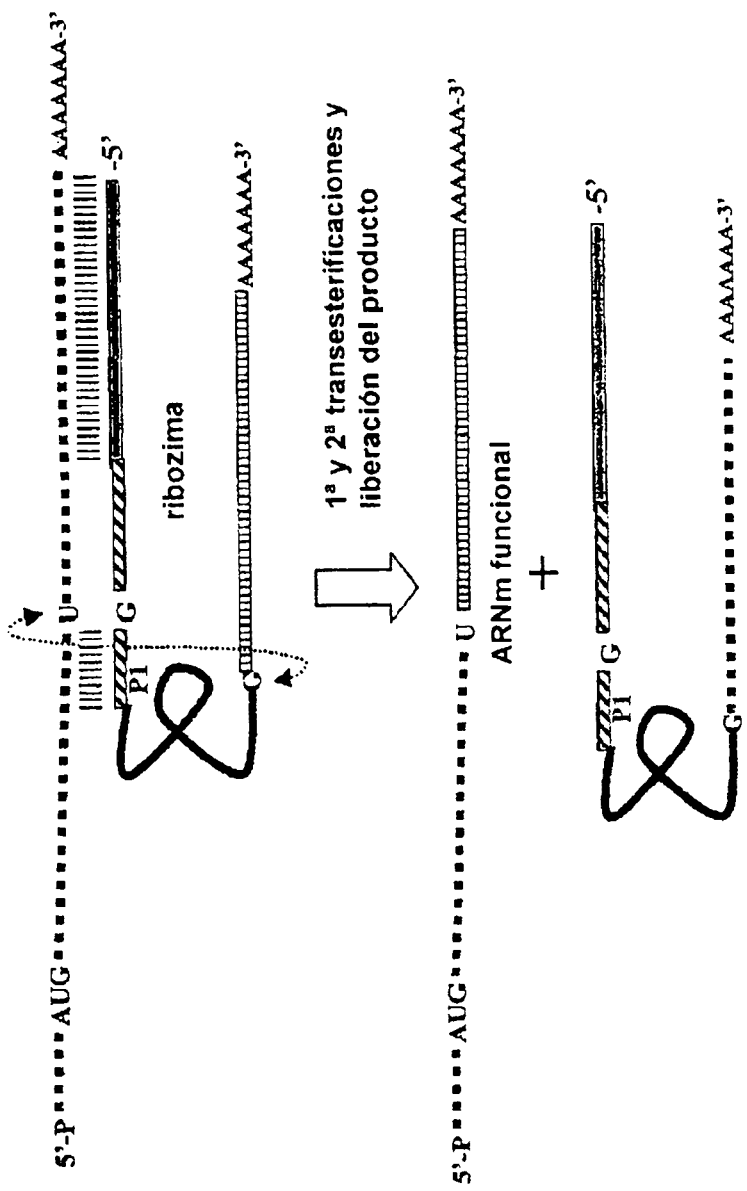


Figura 1

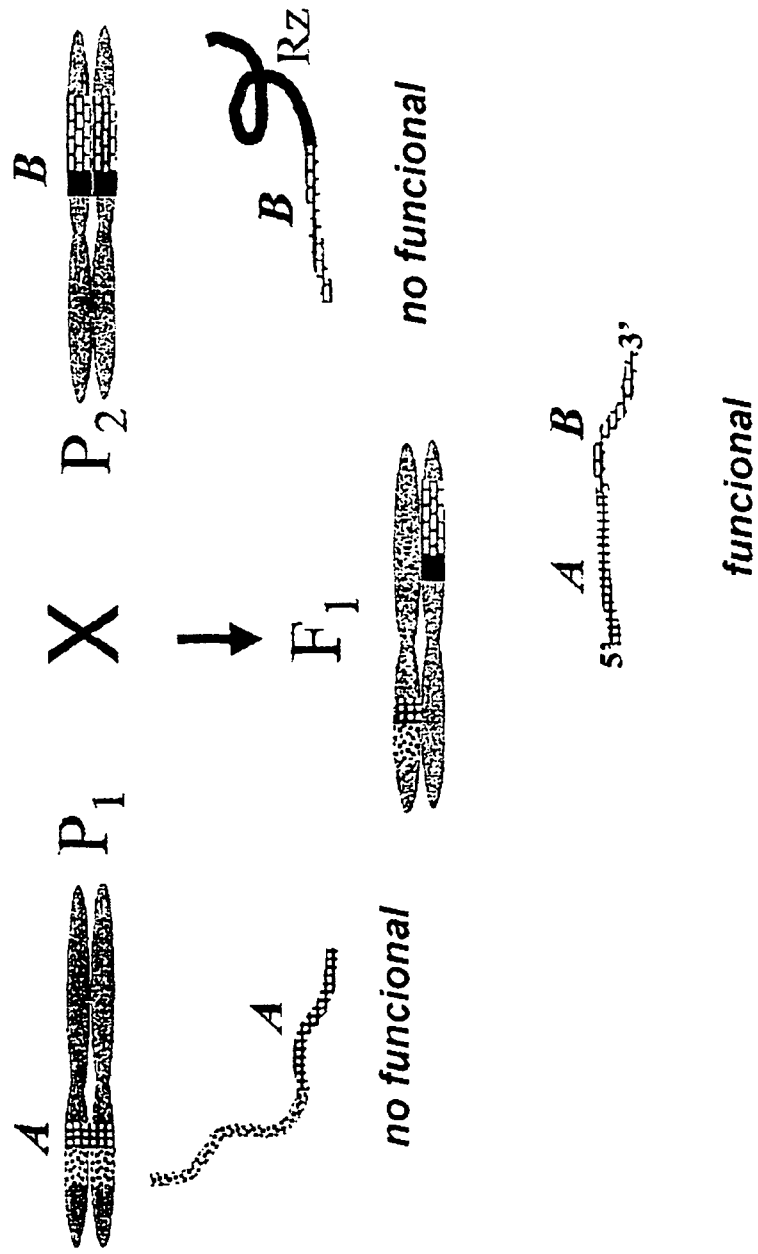


Figura 2A

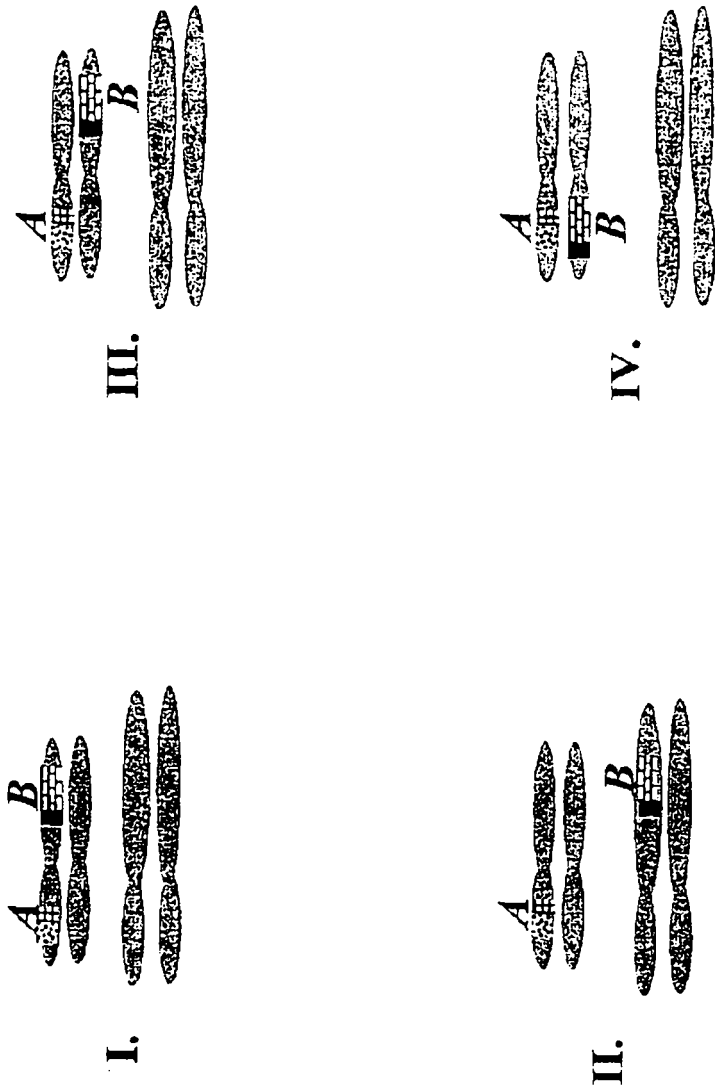


Figura 2B

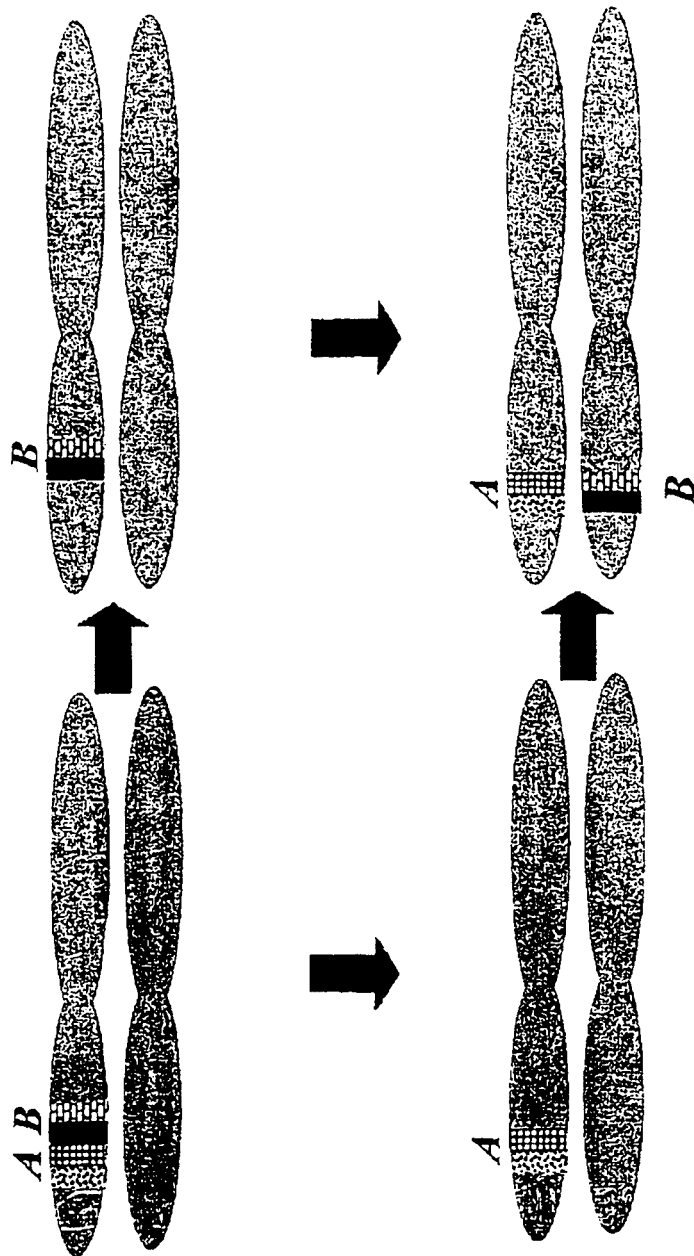
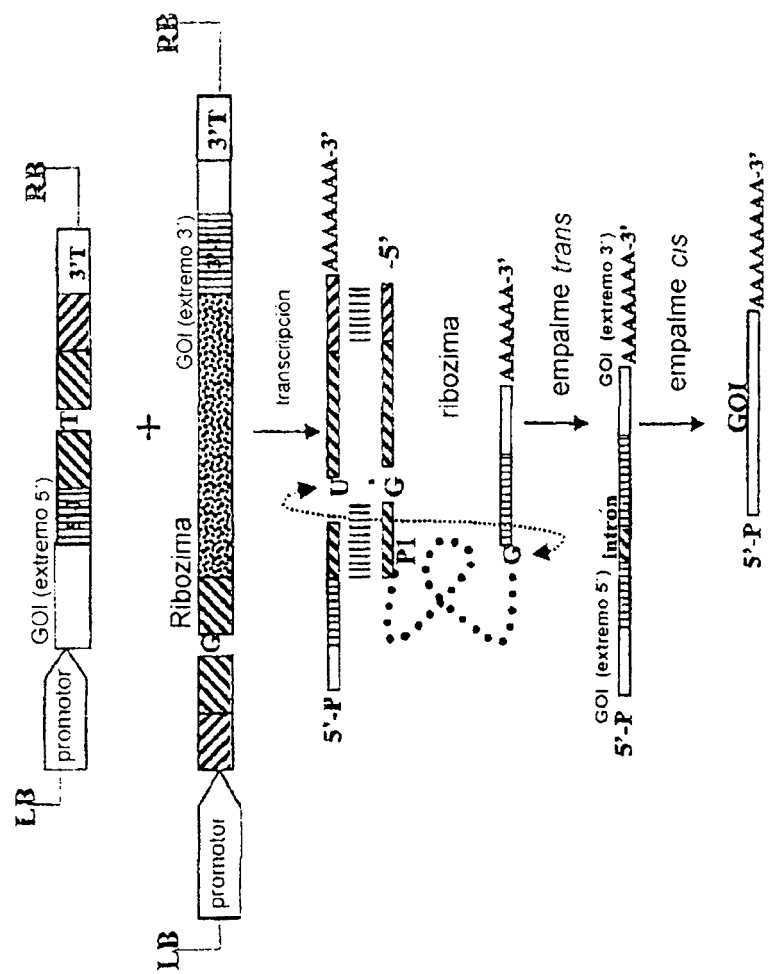


Figura 2C



ARNm Funcional

Figura 3

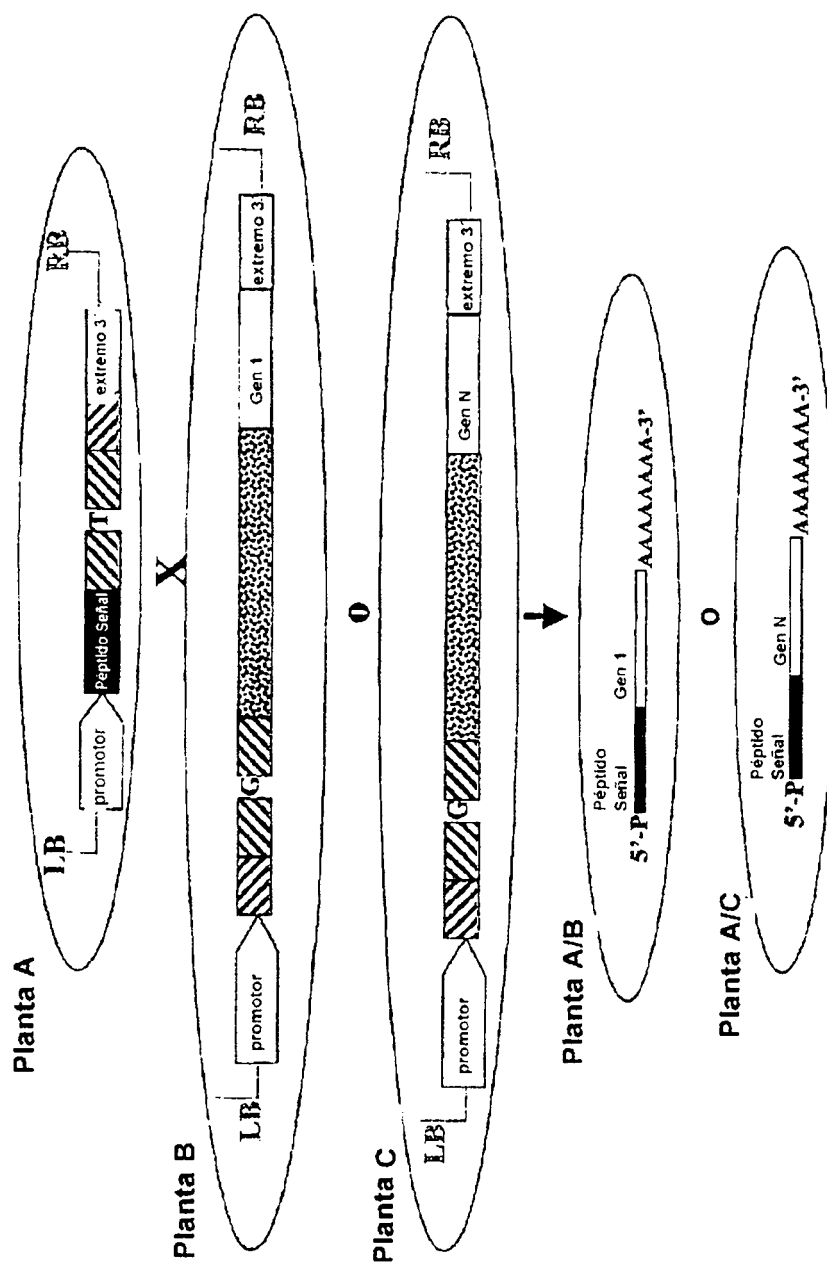


Figura 4

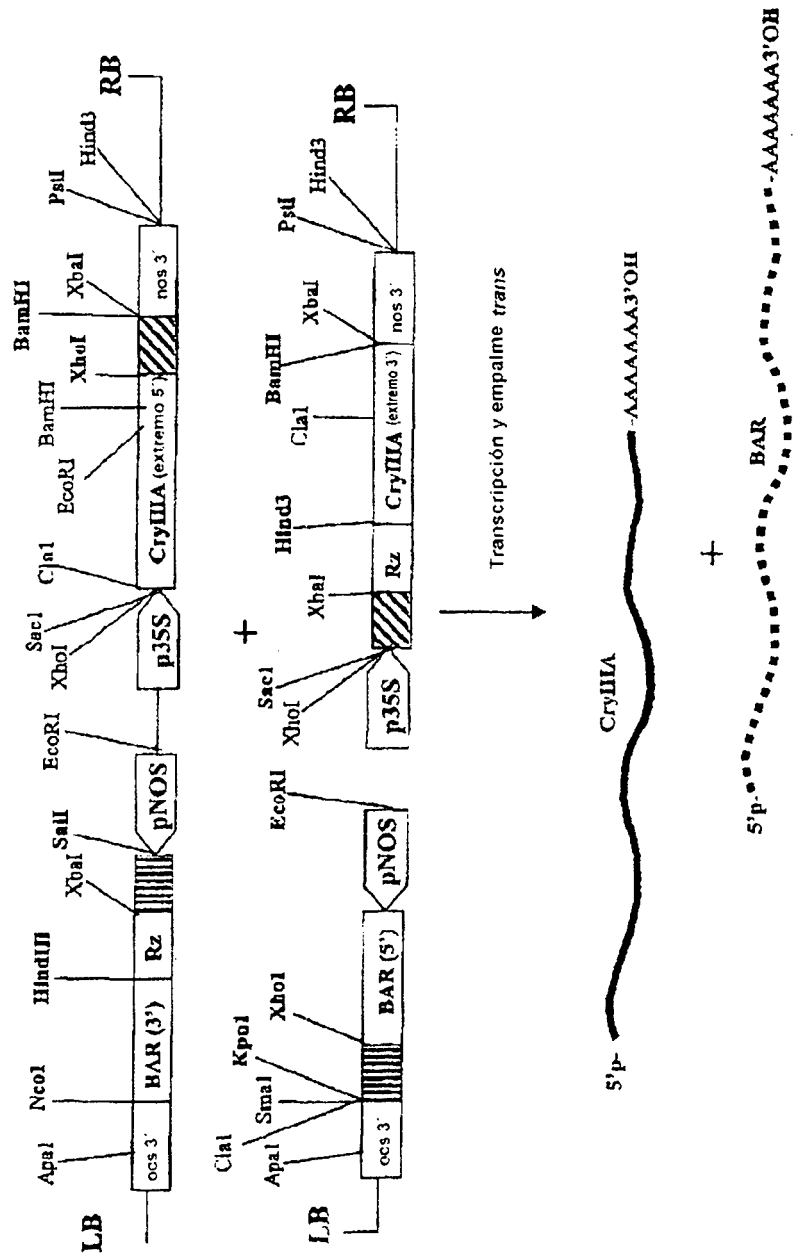


Figura 5

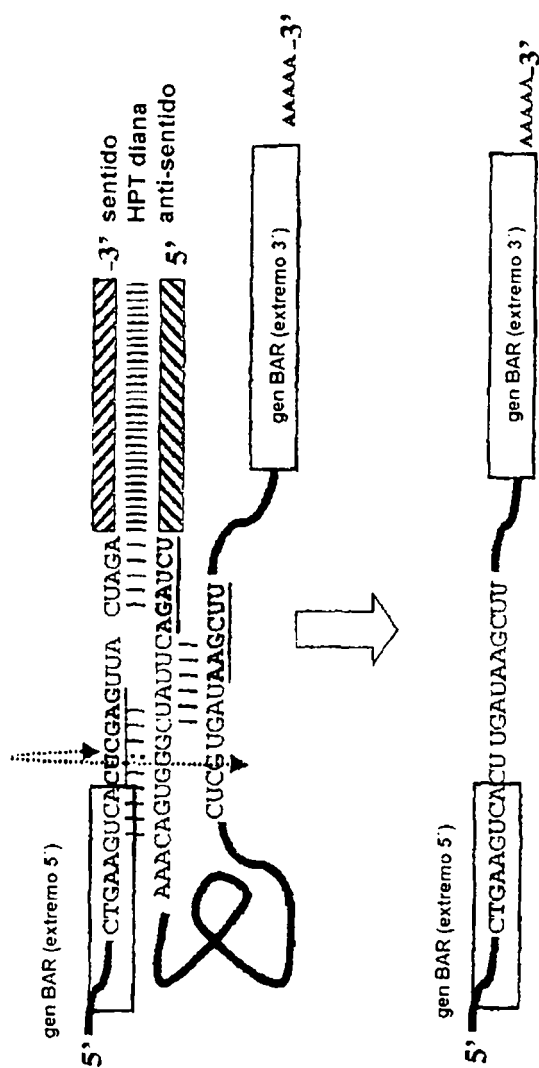


Figura 6

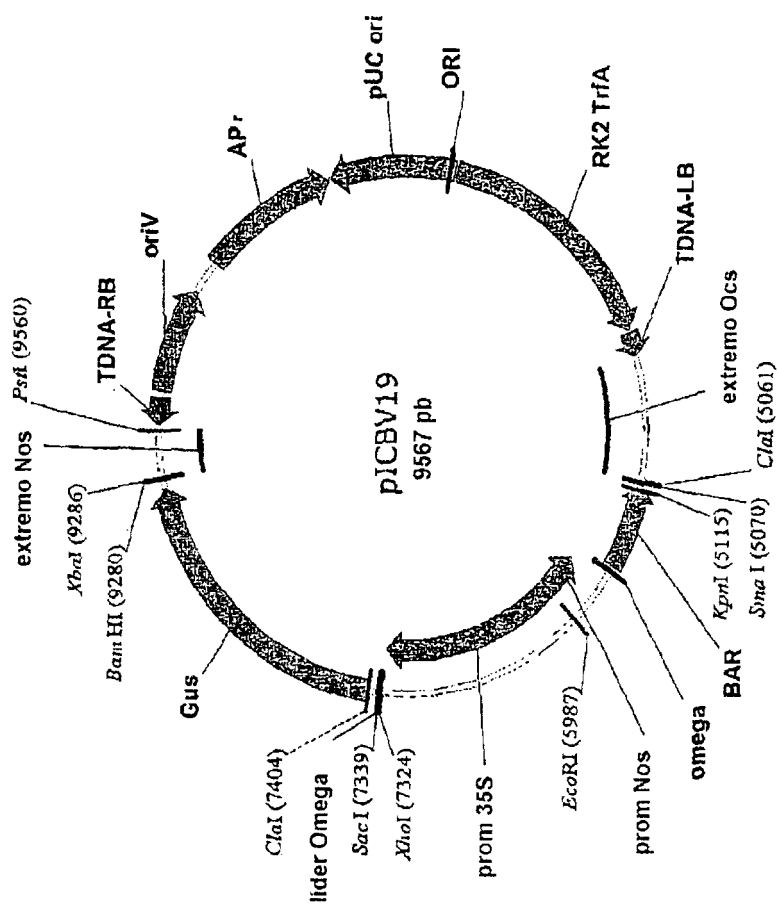


Figura 7