



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 595**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 11/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02028536 .7**
86 Fecha de presentación : **20.12.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1431394**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54

Título: **Método para producir proteínas glicosiladas heterólogas en células de briofita.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73

Titular/es: **greenovation Biotech GmbH**
Botzinger Strasse 29B
79111 Freiburg i.Br, DE

72

Inventor/es: **Lienhart, Otmar;**
Koprivova, Anna;
Decker, Eva;
Reski, Ralf;
Gorr, Gilbert y
Stemmer, Christian

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 269 595 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

Método para producir proteínas glicosiladas heterólogas en células de briofita.

5 Antecedentes

La presente invención está relacionada con un método para producir proteínas glicosiladas heterólogas en células de briofita, como, por ejemplo, en células transformadas de *Physcomitrella patens* en cultivo. En particular, el método está relacionado con un método para producir proteínas glicosiladas que contienen patrones de glicosilación animal, como, por ejemplo, proteínas farmacéuticas que se utilizan en mamíferos, incluidos los humanos, en células de briofita, como, por ejemplo, células de *Physcomitrella patens*, el material genético requerido en consecuencia, como, por ejemplo, ADN y ARN, vectores, células hospedadoras, métodos de introducción del material genético en ellos y usos de los mismos.

En el pasado, se han producido proteínas heterólogas utilizando diversos sistemas de células transformadas, como los obtenidos de líneas de células de bacterias, hongos, como, por ejemplo, levaduras, insectos, plantas o mamíferos (Kudo T. 1994, En: Y. Murooka y T. Amanaka (Editores) Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, págs. 291-299, Marcel Dekker, Nueva York; Harashima S., Bioproc. Technol. 1994, 19: 137-158; Archer D.B. 1994, En: Y. Murooka y T. Amanaka (Editores) Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, págs. 373-393, Marcel Dekker, Nueva York; Goosen M.F.A. 1993, En: M.F.A. Goosen, A. Baugulis y P. Faulkner (Editores) Insect cell culture engineering, págs. 1-16, Marcel Dekker, New York; Hesse F. & Wagner R., Trends in Biotechnol. 2000, 18(4): 173-180).

Las proteínas producidas en organismos procariotas pueden no ser modificadas postraduccionalmente de una forma similar a la de las proteínas eucariotas producidas en sistemas eucariotas, p.e., pueden no ser glicosiladas con azúcares apropiados en residuos de aminoácidos particulares, como, por ejemplo, residuos (N) de ácido aspártico (glicosilación ligada a N). Adicionalmente, el plegamiento de las proteínas eucariotas producidas mediante bacterias puede resultar inapropiado debido a, por ejemplo, la incapacidad de la bacteria para formar puentes de disulfuro de cisteína. Además, las proteínas recombinantes producidas mediante bacterias se agregan y acumulan con frecuencia en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

Los sistemas de células eucariotas resultan más adecuados para la producción de las proteínas glicosiladas que se encuentran en diversos organismos eucariotas, como los humanos, puesto que tales sistemas de células pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales, como, por ejemplo, la glicosilación de las proteínas producidas. Sin embargo, un problema que se encuentra en los sistemas de células eucariotas que han sido transformados con genes heterólogos apropiados para la producción de secuencias de proteínas destinadas a ser utilizadas, por ejemplo, como productos farmacéuticos, es que el patrón de glicosilación en esas proteínas adquiere frecuentemente un patrón nativo, es decir, el del sistema de células eucariotas en el que se ha producido la proteínas: se producen proteínas glicosiladas que contienen patrones de glicosilación no animal y estos, a su vez, pueden ser inmunogénicos y/o alérgicos si se aplican a animales, incluidos los humanos.

La utilización de glicoproteínas recombinantes producidas por plantas superiores está limitada por la N-glicosilación específica de la planta que se aplica sobre dichas proteínas. Comparadas con las glicoproteínas obtenidas de mamíferos, las glicoproteínas específicas de las plantas superiores contienen dos residuos adicionales. Además, en las glicoproteínas de las plantas superiores no se encuentran residuos terminales de beta 1,4-galactosa, lo que indica que en las plantas no se encuentra presente una beta 1,4-galactosiltransferasa. Se ha descrito la integración y la expresión estables de esta enzima en plantas de tabaco (Bakker y otros (2001) *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2899-2904) así como en células BY2 de tabaco (Palacpac y otros (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 4692-4697). La beta 1,4-galactosiltransferasa recombinante humana resultó ser funcional y las proteínas aisladas a partir del material transgénico mostraron residuos terminales de beta 1,4-galactosa. A pesar de todo, no se cree que sea posible suprimir en las plantas superiores las actividades de la beta 1,2-xilosiltransferasa y de la alfa 1,3-fucosiltransferasa, las dos enzimas que se consideran responsables de transferir los residuos adicionales específicos de las plantas. Estos residuos se consideran alérgicos para los humanos (García-Cassado y otros (1996) *Glycobiology* 6, 471-477; van Ree y otros, 2000, *J. Biol. Chem.* 275, nº 15, 11451-11458). Todos los datos sobre la N-glicosilación específica de las plantas se han generado en estudios con plantas superiores.

El documento WO 01/29242 A divulga plantas superiores que han sido modificadas para expresar una beta-galactosiltransferasa de mamífero (GalT) con objeto de producir proteínas heterólogas con glicanos análogos a los de los mamíferos. Con este fin, se sugiere reducir la actividad de las xilosil o fucosil transferasas propias de la planta mediante una estrategia antisentido utilizando constructos antisentido que hayan sido transformados de forma independiente y por separado entre sí.

Para la producción de proteínas recombinantes también se puede utilizar la briofita, *Physcomitrella patens*, una planta terrestre haploide no vascular. Por ejemplo, en el documento WO 01/25456 A y Schaefer, D.G. y otros, "Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*", Plan J., vol. 11, nº 6, págs. 1195-1206 (1997), se demuestra que se pueden utilizar con éxito las briofitas para producir proteínas heterólogas funcionales y que la tecnología es bien conocida y la manipulación dirigida de un gen particular es posible.

El ciclo biológico de los musgos está dominado por la generación gametofítica fotoautotrófica. El ciclo de vida es completamente diferente del de las plantas superiores, en el que la generación dominante es la esporofítica y existen en particular muchas diferencias que se pueden observar entre las plantas superiores y los musgos.

5 El gametofito de los musgos se caracteriza por dos etapas de desarrollo distintas. El protonema, que se desarrolla mediante crecimiento apical, se transforma en una red filamentososa de sólo dos tipos de células (células de cloronema y de caulonema). La segunda fase, llamada gametóforo, se diferencia mediante crecimiento caulinar a partir de un sistema apical simple. Las dos fases son fotoautotróficamente activas. Se ha mostrado que es posible cultivar protonema sin que se diferencie en el, más complejo, gametóforo para cultivos en suspensión en matraz, así como para cultivos de fermentadores (documento WO 01/25456). Para las plantas superiores, no se describe el cultivo de tejidos multicelulares completamente diferenciados y fotoautotróficamente activos que contengan sólo unos pocos tipos de células. La estabilidad genética de los sistemas de células de musgo proporciona una ventaja importante frente a los cultivos de células de plantas y se ha confirmado la estabilidad de cultivos de briofitas fotoautotróficamente activas (Rieck 1996, *Strukturaufklärung und stereochemische Untersuchungen von Sesquiterpenen als Inhaltsstoffe atherischer Ole*. Tesis doctoral, Universidad de Hamburgo). En cultivos de células de plantas superiores, el metabolismo secundario está más diferenciado, lo que da lugar a diferencias en los perfiles metabólicos secundarios.

Además, existen algunas diferencias importantes entre los musgos y las plantas superiores a nivel bioquímico. La asimilación de sulfatos en *Physcomitrella patens* difiere de forma significativa de la de las plantas superiores. La enzima clave para la asimilación de sulfatos en las plantas superiores es la adenosina 5'-fosfosulfato reductasa. En *Physcomitrella patens* coexiste una ruta alternativa a través de la fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa (Koprivova y otros (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 32195-32201). Esta ruta no ha sido descrita en las plantas superiores.

Adicionalmente, muchos miembros de las familias de los musgos, algas y helechos producen una amplia gama de ácidos grasos poliinsaturados (Dembitsky (1993) *Prog. Lipid Res.* 32, 281-356). Por ejemplo, se cree que el ácido araquidónico y el ácido eicosapentanoico son producidos sólo por las plantas inferiores y no por las plantas superiores. Algunas enzimas del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (delta 6-grupo-acilo desaturasa) (Girke y otros (1998), *Plant J.* 15, 39-48) y un componente de una delta 6 elongasa (Zank y otros (2002) *Plant J.* 31, 255-268) han sido clonadas a partir de *Physcomitrella patens*. En las plantas superiores no se han encontrado los genes correspondientes. Este hecho parece confirmar que existen diferencias esenciales entre las plantas superiores y las plantas inferiores a nivel bioquímico.

Otras diferencias se reflejan en la regeneración de la pared celular. Los protoplastos obtenidos a partir de plantas superiores regeneran las paredes de las células nuevas de forma rápida, independientemente del medio de cultivo. La transferencia directa de ADN vía polietilenglicol (PEG) a los protoplastos de las plantas superiores requiere la incubación previa entre 4 y 10°C para lentificar el proceso de regeneración de la pared celular (Patente de los Estados Unidos 5508184). Por el contrario, la regeneración de la pared celular de los protoplastos obtenidos a partir de protonema de *Physcomitrella* depende del medio de cultivo. Los protoplastos se pueden cultivar sin regeneración de la pared celular durante largos períodos. Sin intención de estar limitados por la teoría, parece que la maquinaria de secreción del protoplasto del musgo, esencial para la regeneración de la pared celular y la glicosilación de la proteína, difiere de la de las plantas superiores. Además, *Physcomitrella patens* muestra una recombinación homóloga muy eficiente en el ADN de su núcleo, una característica exclusiva de las plantas que permite la ruptura dirigida de genes (Girke y otros (1998) *Plant J.* 15, 39-48; Strepp y otros (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4368-4373; Koprivova (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 32195-32201; revisado por Reski (1999) *Planta* 208, 301-309; Schaefer y Zryd (2001) *Plant Phys* 127, 1430-1438; Schaefer (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 477-501), ilustrando aún más las diferencias fundamentales respecto a las plantas superiores. Sin embargo, la utilización de este mecanismo para alterar los patrones de glicosilación ha demostrado ser problemática, como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud. La ruptura de la N-acetilglucosaminiltransferasa I (GNT1) en *Physcomitrella patens* dio como resultado la pérdida del transcripto específico, pero sólo diferencias menores del patrón de N-glicosilación. Estos resultados contrastan directamente con la pérdida de glicanos del complejo de Golgi modificado en una planta *Arabidopsis thaliana* mutante carente de la GNT1 observados por von Schaewen y otros (1993) *Plant Physiol* 102, 1109-1118). Así pues, en *Physcomitrella patens* la inactivación génica no dio como resultado la modificación esperada del patrón de la N-glicosilación.

A pesar de que la estrategia de inactivación génica no tuvo éxito con el GNT1, los presentes inventores intentaron inactivar la beta 1,2-xilosiltransferasa (XylT) y la alfa 1,3-fucosiltransferasa (FucT) en *Physcomitrella patens*. En las plantas resultantes no fue posible detectar transcriptos específicos. Sorprendentemente, se descubrió que los glicanos ligados a N aislados a partir de las plantas transgénicas se habían modificado de la forma deseada. No se pudieron detectar residuos de fucosil ligado a 1,3 sobre los glicanos ligados a N de plantas con la FucT inactivada y tampoco se pudieron detectar residuos de xilosil ligado a 1,2 sobre los glicanos ligados a N de plantas con la XylT inactivada. Las líneas transgénicas aisladas mostraron un crecimiento normal, lo que resulta sorprendente considerando que la glicosilación específica de la planta se conserva en gran medida y, por lo tanto, se debería esperar que resultara significativa para la función. En consecuencia, se debería haber esperado que las inactivaciones génicas dobles tuvieran un efecto perjudicial sobre el crecimiento del musgo. Además, se esperaban compensaciones, pero, sorprendentemente, no se observaron. Por otra parte, la doble inactivación de FucT y XylT dio como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y de xilosil ligado a 1,2.

La integración de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana en el genoma de una planta *Physcomitrella patens* doblemente inactivada dio como resultado un patrón de glicosilación ligada a N similar al de los mamíferos sin los

residuos de fucosil y xilosil específicos de la planta y con residuos 1,4 galactosil terminales similares a los de los mamíferos. Se encontró que la galactosiltransferasa era activa. No se esperaba una modificación semejante de los glicanos ligados a N sin pérdida de viabilidad, puesto que la N-glicosilación es muy compleja y está bien regulada. No sólo depende de las fases de desarrollo (para las plantas: Elbers y otros (2001) *Plant Phys* 126, 1314-1322) sino que también depende de las condiciones de cultivo (para cultivo de células de mamífero: Hills y otros (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75, 239-251).

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método más eficiente para producir proteínas animales que contengan patrones de glicosilación animal y, en particular, proteínas humanas glicosiladas que contengan patrones de glicosilación humana sobre las mismas. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un proceso eficiente para la producción en briofitas, como, por ejemplo *Physcomitrella patens*, de proteínas animales heterólogas que contengan patrones de glicosilación animal, en particular proteínas humanas, que contengan patrones de glicosilación humana.

Estos y otros objetivos resultarán evidentes a partir de la descripción y ejemplos siguientes proporcionados en la presente solicitud.

Descripción detallada

Según la presente invención, se proporciona una célula de briofita transformada que comprende una doble inactivación génica de fucosiltransferasa y xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 ni de xilosil ligado a 1,2.

La célula de briofita de la invención procede de un musgo seleccionado de un grupo de musgos que incluye las hepáticas, de especies del género *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*, *Ceratodon*, *Marchantia* y *Sphaerocarpos*. La célula de briofita es, preferiblemente, de *Physcomitrella patens*.

La célula de briofita, como, por ejemplo, la célula de *Physcomitrella patens*, puede ser cualquier célula apropiada para ser transformada según métodos de la invención como los descritos en la presente solicitud, y puede ser un protoplasto de musgo, una célula de tejido de protonema u otro tipo de célula. Ciertamente, el destinatario experimentado percibirá que el tejido de plantas de musgo que comprende poblaciones de células de briofita transformadas según la invención, como, por ejemplo, tejido de protonema transformado, también constituye un aspecto de la presente invención.

El término “disfuncional”, tal como se utiliza en la presente solicitud, significa que las secuencias de nucleótidos de transferasa designadas, de fucosiltransferasa (fucT) y xilosiltransferasa (xylT), son esencialmente incapaces de codificar ARNm que codifique para proteínas funcionales fucT y xylT que son capaces de modificar glicanos ligados a N de plantas con patrones de glicosilación similares a los de las plantas que contengan residuos fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2. En un modo preferido, las secuencias de nucleótidos de la transferasa de plantas fucT y xylT disfuncionales, comprenden inserciones dirigidas de secuencias de nucleótidos exógenas en las endógenas, es decir, genes fucT y xylT genómicos, nativos que forman parte del genoma del núcleo de la briofita (tanto si se trata de un genoma verdaderamente nativo de briofita, que pertenece a células de briofita que no han sido transformadas previamente por el hombre con otras secuencias de ácidos nucleicos, como un genoma del núcleo de una briofita transformado en el que se han realizado previamente inserciones de las secuencias de ácidos nucleicos deseados), lo que inhibe o reprime en gran medida la transcripción del ARNm que codifica para la actividad funcional de la transferasa fucT y xylT.

Las células de briofita de la invención o antecesoras de las mismas pueden ser cualesquiera que hayan sido transformadas previamente con genes heterólogos de interés que codifican para secuencias primarias de proteínas de interés glicosiladas con patrones de glicosilación de mamífero como se describe en la presente solicitud. Preferiblemente, los patrones de glicosilación son de tipo humano. Alternativamente, la célula de briofita se puede transformar de diversas formas, esto es, simultáneamente o a lo largo del tiempo, con secuencias de nucleótidos que codifican para al menos una secuencia de proteína primaria de interés, típicamente al menos una proteína farmacéutica de interés que se utilizan en humanos o mamíferos, como, por ejemplo, especies de ganado, incluyendo especies bovinas, ovinas, equinas y porcinas, que requieren que se les apliquen patrones de glicosilación de mamífero según los métodos de la invención como los descritos en la presente solicitud. Dichas glicoproteínas farmacéuticas utilizadas en mamíferos, incluido el hombre, incluyen, pero no se limitan a, proteínas como, por ejemplo, insulina, preproinsulina, VEGF, proinsulina, glucagón, interferones, como, por ejemplo, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factores de coagulación de la sangre elegidos entre Factor VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad, incluyendo la hormona luteinizante, la hormona estimuladora del folículo, factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor estimulante de colonias de granulocitos, y similares, prolactina, oxitocina, la hormona estimuladora de la tiroides, la hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, la hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas, como, por ejemplo, betaglucoocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, proteínas de fusión, como, por ejemplo, la proteína de fusión del dominio de unión del ligando del receptor alfa del TNF con una porción Fc de la IgG, etc. Adicionalmente, el método de la invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos, como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos activos de los mismos.

En un modo preferido, se proporciona una célula de briofita transformada que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y de xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2 y iii) una secuencia de nucleótidos ligada de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en dicha célula de briofita, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una galactosiltransferasa de mamífero funcional que se expresa en la célula de briofita.

En otro modo preferido adicional, la secuencia de nucleótidos de la galactosiltransferasa de mamífero es una secuencia de nucleótidos beta-1,4 galactosiltransferasa (beta-1,4 galT) y más preferiblemente una beta-1,4 galactosiltransferasa humana. El destinatario experimentado percibirá que la secuencia de nucleótidos beta-1,4 galT puede ser una secuencia ADNc o una secuencia de ADN genómico y puede comprender una secuencia beta-1,4 galT de nucleótidos degenerativamente equivalente, siempre y cuando el patrón de glicosilación de los glicanos ligados a N sobre cualquier proteína exógena glicosilada deseada que haya sido producido en las células de briofita transformadas o tejido de briofita de la invención sea en gran medida, si no completamente, de mamífero y, más preferiblemente, si resulta apropiado, humano.

Existe información detallada sobre el cultivo de musgos apropiados para ser utilizados en la invención, como, por ejemplo, *Leptobryum pyriforme* y *Sphagnum magellanicum*, en fermentadores, que es conocida en la técnica anterior (véase, por ejemplo, E. Wilbert, "Biotechnological studies concerning the mass culture of mosses with particular consideration of the arachidonic acid metabolism", tesis doctoral, Universidad de Mainz (1991); H. Rudolph y S. Rasmussen, Studies on secondary metabolism of Sphagnum cultivated in bioreactors, Crypt. Bot., 3, págs. 67-73 (1992)). Para los fines de la presente invención es especialmente preferida la utilización de *Physcomitrella patens*, puesto que las técnicas de biología molecular se practican sobre este organismo (para consulta, véase R. Reski, Development, genetics and molecular biology of mosses, Bot. Acta, 111, págs. 1-15 (1998)).

Se han desarrollado sistemas de transformación apropiados para la explotación biotecnológica de *Physcomitrella* para la producción de proteínas heterólogas. Por ejemplo, se han realizado con éxito transformaciones mediante transferencia directa de ADN al tejido de protonema utilizando pistolas génicas. También se ha logrado con éxito la transferencia de ADN mediada por PEG a protoplastos de musgo. El método de transformación mediada por PEG ha sido descrito muchas veces para *Physcomitrella patens* y da lugar tanto a transformantes transitorios como estables (véase, por ejemplo, K. Reutter y R. Reski, Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants, Pl. Tissue culture and Biotech., 2, págs. 142-147 (1996)).

En otro modo de realización de la presente invención se proporciona un método para producir al menos una célula de briofita que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y de xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2, que comprende introducir en dicha célula i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de fucosiltransferasa endógena y ii) introducir en dicha célula una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de xilosiltransferasa endógena.

Consecuentemente, la presente invención también proporciona un conjunto de vectores de ácidos nucleicos apropiado para producir al menos una célula de briofita transformada que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y de xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2, en la que dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos comprende i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de fucosiltransferasa endógena y ii) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de xilosiltransferasa endógena.

Según un modo de realización preferido, dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos incluye, además, un polinucleótido que codifica un polipéptido glicosilado. Según otro modo de realización preferido, dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos incluye, además, un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa de mamífero funcional, preferiblemente una galactosiltransferasa de mamífero, siendo el más preferido un polinucleótido que codifica una beta-1,4 galactosiltransferasa humana.

A partir de dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos, la presente invención también proporciona células hospedadoras que contienen un conjunto semejante de vectores, métodos para la producción de dichas células hospedadoras, incluida la incorporación de dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos a la célula por medio de transformación y la utilización del conjunto de vectores de ácidos nucleicos en la producción de células de briofita transgénicas.

El destinatario experimentado percibirá que el orden de introducción de dichas primera y segunda secuencias mencionadas de ácidos nucleicos de la transferasa en la célula de briofita no es importante: se puede realizar en cualquier orden. La primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos se pueden dirigir a porciones específicas de los genes endógenos nativos fucT y xylT localizados en el genoma nuclear de la célula de briofita, definidos mediante sitios de enzimas de restricción específicas de los mismos, por ejemplo, según los ejemplos que se proporcionan en la presente solicitud. Atacando específicamente a las secuencias de los genes de la transferasa fucT y xylT nativa con secuencias de nucleótidos que se integran específicamente con los genes de transferasa nativa diana de interés, la expresión de dichas secuencias se ve afectada en gran medida, si no completamente interrumpida.

ES 2 269 595 T3

En un modo de realización preferido de la presente invención se proporciona un método para producir al menos una proteína de mamífero glicosilada heteróloga o exógena en una célula de briofita transformada, que comprende:

- 5 i) introducir en dicha célula un primer ácido nucleico aislado que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de fucosiltransferasa endógena; y
- ii) introducir en dicha célula una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de xilosiltransferasa endógena; y
- 10 iii) introducir en dicha célula una tercera secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende un ácido nucleico ligado de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en una célula de briofita, donde dicho ácido nucleico codifica al menos un polipéptido de galactosiltransferasa de mamífero.

En este modo de realización de la invención, el al menos un polipéptido de galactosiltransferasa de mamífero es, preferiblemente, beta-1,4 galactosiltransferasa (beta-1,4 galT) y, más preferiblemente, una secuencia de nucleótidos de beta-1,4 galactosiltransferasa humana.

Preferiblemente, todas las proteínas de mamífero glicosiladas mencionadas más arriba en la presente solicitud, son de tipo humano. Otras proteínas que se consideran para producción en la presente invención incluyen proteínas que se utilizan en cuidados veterinarios y pueden corresponder a homólogos animales de las proteínas humanas mencionadas en la presente solicitud.

Un promotor exógeno es aquel que designa a un promotor que se introduce delante de una secuencia de ácidos nucleicos de interés y está asociado a la misma de modo que se pueda manipular. Así pues, un promotor exógeno es aquel que se ha colocado delante de un componente de ácido nucleico seleccionado como se ha definido en la presente solicitud y no está compuesto por el promotor natural o nativo normalmente asociado con el componente de ácidos nucleicos de interés tal como se encuentra en circunstancias salvajes. Así pues, un promotor puede ser nativo para una célula de briofita de interés pero puede no estar asociado de modo que se pueda manipular con el ácido nucleico de interés frontal en célula de briofita salvaje. Típicamente el promotor exógeno es aquel que se transfiere a una célula de briofita hospedadora desde un origen distinto de la célula hospedadora.

Los ADNc que codifican para las proteínas galT, las proteínas glicosiladas y las de mamífero que se describen en la presente solicitud, contienen al menos un tipo de promotor que es manipulable en una célula de briofita, por ejemplo, un promotor inducible o constitutivo ligado de modo que se pueda manipular a una secuencia de ácidos nucleicos galT y/o una segunda secuencia de ácidos nucleicos para una proteína de mamífero glicosilada como se ha definido en la presente solicitud y como se ha proporcionado a través de la presente invención. Como se ha argumentado, ello permite controlar la expresión de los genes.

El término “inducible” tal como se aplica a un promotor es suficientemente comprendido por aquellos experimentados en la técnica. En esencia, bajo el control de un promotor inducible la expresión se activa o aumenta en respuesta a un estímulo aplicado (que puede haberse generado dentro de la célula o proporcionado de forma exógena). La naturaleza del estímulo varía de unos promotores a otros. En ausencia del estímulo apropiado, algunos promotores inducibles dan lugar a unos niveles de expresión bajos o indetectables (o nulos). Otros promotores inducibles dan lugar a una expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión a partir de cualquier promotor inducible aumenta en presencia del estímulo correcto. La situación preferible es aquella en la que el nivel de expresión aumenta hasta un valor efectivo para alterar una característica fenotípica al aplicar el estímulo relevante. Así pues, se puede utilizar un promotor inducible (o “activable”) que da lugar a un nivel de expresión básico en ausencia del estímulo, cuyo nivel es demasiado bajo para inducir un fenotipo deseado (y, de hecho, puede ser cero). Al aplicar el estímulo, la expresión aumenta (o se activa) hasta un nivel que induce el fenotipo deseado.

Como se ha indicado en la presente solicitud, los sistemas de expresión de las briofitas también son conocidos para el experto en la técnica. Un promotor de briofita, en particular un promotor de *Physcomitrella patens*, es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa dependiente de un ADN hospedador e iniciar la transcripción aguas abajo (3') de una secuencia de codificación (p.e., gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente es proximal respecto al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión de la ARN polimerasa (la caja TATA) y un sitio de comienzo de la transcripción. Un promotor de briofita puede contener también un segundo dominio denominado secuencia activadora aguas arriba (UAS), que, si está presente, es normalmente distal respecto al gen estructural. La UAS permite expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva tiene lugar en ausencia de UAS. La expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, reforzando o reduciendo por consiguiente la transcripción.

El destinatario experimentado percibirá que las secuencias promotoras de briofita que codifican enzimas en las rutas metabólicas de las briofitas pueden proporcionar secuencias promotoras particularmente útiles.

Además, también pueden funcionar como promotores de briofitas otros promotores sintéticos que no existen en la naturaleza. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de briofita se pueden unir a la región de activación de la transcripción de otro promotor de briofita, creando un promotor híbrido sintético. Un ejemplo de un promotor

apropiado es el utilizado en el sistema de expresión de TOP 10 para *Physcomitrella patens* por Zeidler y otros (1996) Plant. Mol. Biol. 30, 199-205). Adicionalmente, un promotor de briofita puede incluir otros promotores que existen de forma natural de origen no briofítico que tengan la capacidad para unirse a una ARN polimerasa dependiente de ADN de una briofita e iniciar la transcripción. Los ejemplos de estos promotores incluyen los descritos, entre
 5 otros, el promotor P-Actin 1 del arroz y el promotor RbcS de las clamidomonas (Zeidler y otros (1999) J. Plant Physiol. 154, 641-650). Cohen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1078, 1980; Henikoff y otros, Nature, 283:285, 1981; Hollenberg y otros, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 96: 119, 198 1; Hollenberg y otros, "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", en: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timms y A. Puhler), 1979; Mercerau-Puigalon y otros, Gene, 11: 163, 1980;
 10 Panthier y otros, Curr. Genet., 2: 109, 1980.

Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente en briofitas. Una secuencia de un promotor puede estar directamente ligada a la molécula de ADN, en cuyo caso, el primer aminoácido del N-término de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada mediante el codón de inicio AUG en el ARNm. Si
 15 se desea, la metionina del N-término puede escindirse de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Alternativamente, también se pueden secretar proteínas extrañas de la célula de briofita en el medio de crecimiento creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión constituida por un fragmento de una
 20 secuencia líder que hace posible la secreción en el interior o el exterior de las células de briofita de la proteína extraña. Preferiblemente, hay sitios de proceso codificados entre el fragmento líder y el gen extraño, que se pueden escindir tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal constituido por aminoácidos hidrofóbicos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula.

Las secuencias señal adecuadas de codificación del ADN se pueden obtener a partir de genes, dado que existen proteínas de briofita secretadas, como, por ejemplo, líderes de origen no briofítico, como, por ejemplo, un líder de VEGF, que también pueden hacer posible la secreción en las células de briofita.

Las secuencias de terminación de la transcripción que son reconocidas por, y funcionales en, las células de briofita son regiones reguladoras localizadas 3' respecto del codón de terminación de la traducción, y de este modo, junto con el promotor, flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede ser traducido en el polipéptido codificado por el ADN. Un ejemplo de una secuencia de terminación apropiada que opera en *Physcomitrella patens* es la región de terminación del virus del mosaico de la coliflor.

Típicamente, los componentes, incluyendo promotor, líder (si se desea), secuencia de codificación de interés y secuencia de terminación de la transcripción, se agrupan en un constructo de expresión de la invención. Los constructos de expresión se mantienen con frecuencia en un plásmido de ADN, que es un elemento extracromosómico capaz de mantenerse estable en un hospedador, como, por ejemplo, una bacteria. El plásmido de ADN puede tener dos orígenes de replicación, permitiendo de este modo que se pueda mantener, por ejemplo, en una briofita para su expresión y
 40 en un hospedador procarionota para su clonación y amplificación. En términos generales, es suficiente que el plásmido tenga un origen de replicación para su clonación y amplificación en una célula hospedadora procarionota. Además, un plásmido de ADN puede ser un plásmido con un número de copia alto o bajo. Un plásmido con número de copia alto tendrá generalmente un número de copia desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200, y normalmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 150. Un hospedador que contenga un plásmido con número de
 45 copia alto tendrá, preferiblemente, al menos aproximadamente 10, y, más preferiblemente, al menos aproximadamente 20. Se puede elegir un vector con número de copia tanto alto como bajo, en función del efecto del vector y de la proteína extraña en el hospedador (véase, por ejemplo, Brake y otros, *supra*).

Alternativamente, los constructos de expresión se pueden integrar en el genoma de la briofita con un vector de integración. Los vectores de integración contienen normalmente al menos una secuencia homóloga de un cromosoma de briofita que permite al vector integrarse, y contiene, preferiblemente, dos secuencias homólogas flanqueando la construcción de expresión. Un vector de integración se puede dirigir a un locus específico en el musgo seleccionando la secuencia homóloga apropiada para incluirla en el vector como se describe y ejemplifica en la presente solicitud. Se pueden integrar uno o más constructos de expresión. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden aparecer como un único segmento en el mismo, lo que da como resultado la integración de la totalidad del vector, o como dos segmentos homólogos de segmentos contiguos del cromosoma y flanqueando la construcción de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable únicamente de la construcción de expresión.

Normalmente, los constructos de expresión extracromosómicas e integrantes pueden contener marcadores seleccionables para permitir la elección de las células de briofita que hayan sido transformadas.

Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que se pueden expresar en el hospedador de musgo, como, por ejemplo, los genes de resistencia a G418 o a higromicina B, que confieren a las células de briofita resistencia a G418 y a higromicina B, respectivamente. Además, un marcador seleccionable apropiado también puede
 65 proporcionar a las células de briofita la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, como, por ejemplo, un metal.

ES 2 269 595 T3

Alternativamente, algunos de los componentes descritos más arriba se pueden agrupar en vectores de transformación. Los vectores de transformación se componen normalmente de un marcador seleccionable que, o bien se mantiene en un plásmido de ADN, o se desarrolla en un vector de integración, como se ha descrito más arriba.

5 Los métodos para introducir ADN exógeno en células de briofita son bien conocidos en la técnica y son descritos, entre otros, por Schaefer D.G. "Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens*", (Mayo 2001), Institute of Ecology, Laboratory of Plant Cell Genetics, Universidad de Lausana Didier.Schaefer@ie-pc.unil.ch; Reutter K. y Reski R., Plant Tissue Culture and Biotechnology, Septiembre 1996, Vol. 2, nº 3; Zeidler M. y otros (1996), Plant Molecular Biology 30: 199-205.

10 Aquellos expertos en la técnica están suficientemente capacitados para construir vectores y diseñar protocolos para secuencias de ácidos nucleicos recombinantes o expresión de genes como los descritos más arriba. Se pueden escoger o construir vectores apropiados que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook y otros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. En *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel y otros, eds., John Wiley & Sons, 1992, se describen en detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en preparación de constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión de genes, y análisis de proteínas. Los descubrimientos de Sambrook y otros y de Ausubel y otros se incorporan a la presente solicitud a modo de referencia.

20 Naturalmente, el destinatario experimentado percibirá que cada secuencia de ácido nucleico que codifica para el galT y el polipéptido que se va a glicosilar apropiados se encontrarán bajo el control regulador de su propio promotor y terminador exógenos. Cuando dos o más proteínas diana están destinadas a ser producidas a partir de un mismo ARN transportador, es preferible que se puedan separar fácilmente, por ejemplo uniéndose a diferentes anticuerpos específicos de proteínas (monoclonales o policlonales) en la fase de recolección del sistema de cultivo de células de briofita.

25 Como se ha descrito más arriba, los marcadores genéticos seleccionables pueden facilitar la elección de células de briofita transgénicas, y éstos pueden constar de genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables como se ha sugerido en la presente solicitud.

30 Cuando se introducen secuencias seleccionadas de ácidos nucleicos de glicosiltransferasa y secuencias de polipéptidos para su glicosilación en un célula de briofita, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones suficientemente conocidas para aquellos expertos en la técnica. El(los) ácido(s) nucleico(s) que se va(n) a insertar se debe(n) ensamblar en un constructo, que contenga elementos reguladores efectivos, que guiará la transcripción. Se debe disponer de un método para transportar el constructo al interior de la célula. Una vez que el constructo se encuentra en el interior de la membrana celular, puede o no tener lugar su integración en el material cromosómico endógeno.

35 La invención comprende, además, una célula hospedadora transformada con vectores o constructos como se ha explicado más arriba, especialmente una célula de briofita o microbiana. Así pues, se proporciona una célula hospedadora, como, por ejemplo, una célula de briofita, que incluye secuencias de nucleótidos de la invención como se ha indicado en la presente solicitud. En la célula, la secuencia de nucleótidos se puede incorporar al cromosoma.

40 También según la invención, se proporciona una célula de briofita que tiene incorporada en su genoma al menos una secuencia de nucleótidos, en particular secuencias de nucleótidos heterólogos, como proporciona la presente invención, bajo control operativo de secuencias reguladoras para el control de la expresión como se ha descrito en la presente solicitud. La secuencia codificadora puede estar ligada de modo que se pueda manipular a una o más secuencias reguladoras que pueden ser heterólogas o extrañas respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que se utilizan en la invención, tales como la(s) no naturalmente asociadas a la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos para su expresión. La secuencia de nucleótidos según la invención se puede someter al control de un promotor inducible externamente para que su expresión quede bajo el control del usuario. Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para obtener una célula de briofita semejante, en particular una célula de *Physcomitrella patens*, que implica la introducción de secuencias de ácidos nucleicos que se han considerado para ser utilizadas en la invención, o al menos un vector apropiado, incluyendo las secuencias que se han considerado para ser utilizadas en la invención, en una célula de briofita y provocar o permitir la recombinación entre el vector y el genoma de la célula de briofita para introducir dichas secuencias en el genoma. La invención se extiende a células de briofita, en particular células de *Physcomitrella patens*, que contienen un nucleótido GalT y/o una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de polipéptidos destinada a la incorporación de un patrón de glicosilación de mamífero a la misma y apropiada para ser utilizada en la invención como resultado de la introducción de la secuencia de nucleótidos en una célula antecesora.

45 El término "heterólogo" se puede utilizar para indicar que los genes/secuencias de nucleótidos en cuestión se han introducido en células de briofita, o en antecesoras de las mismas, mediante ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. Se puede proporcionar una célula de briofita transgénica, es decir, transgénica en la secuencia de nucleótidos en cuestión. El transgén puede encontrarse sobre un vector extragenómico o incorporado, preferiblemente de forma estable, en el genoma. Un gen heterólogo puede reemplazar a un gen endógeno equivalente, es decir, un gen que normalmente desempeña la misma función o una similar, o la secuencia insertada puede haber sido añadida al gen endógeno o a otra secuencia. Una ventaja de introducir un gen heterólogo es la posibilidad de someter la expresión

de una secuencia al control de un promotor elegido para poder influir en la expresión según las preferencias. Las secuencias de nucleótidos heterólogas, exógenas o extrañas respecto a una célula de briofita pueden no darse de forma natural en las células de ese tipo, variedad o especie. Así pues, una secuencia de nucleótidos puede contener una secuencia de codificación de, u obtenida a partir de, un determinado tipo de células de briofita, como, por ejemplo, una célula de *Physcomitrella patens*, introducida en el contexto de una célula de briofita de un tipo o especie diferente. Una posibilidad adicional para controlar la expresión consiste en introducir una secuencia de nucleótidos en una célula de briofita en la que aquella o una homóloga se encuentran de forma natural, pero en la que la secuencia de nucleótidos se encuentra ligada y/o adyacente a un ácido nucleico que no existe de forma natural en la célula, o en células de ese tipo o especie o variedad, como, por ejemplo, ligada de modo que se pueda manipular a una o más secuencias reguladoras, como, por ejemplo, una secuencia promotora. Una secuencia en una célula de briofita u otra célula hospedadora puede ser reconociblemente heteróloga, exógena o extraña.

La presente invención también comprende la expresión deseada de los polipéptidos resultante de la combinación de moléculas de ácidos nucleicos según la invención como se divulga en la presente solicitud o que se pueden obtener con arreglo a la información y sugerencias contenidas en la presente solicitud. También se proporcionan métodos para obtener un producto de la expresión semejante mediante la expresión a partir de secuencias de nucleótidos que codifiquen, por lo tanto, bajo condiciones apropiadas en células hospedadoras apropiadas, por ejemplo, *E. coli*. Aquellos expertos en la técnica están suficientemente capacitados para construir vectores y diseñar protocolos y sistemas para la expresión y recuperación de los productos de la expresión de genes recombinantes.

Un polipéptido según la presente invención puede ser un alelo, una variante, un fragmento, un derivado, un mutante o un homólogo de los, o de unos, polipéptidos como se ha mencionado en la presente solicitud. El alelo, variante, fragmento, derivado, mutante u homólogo puede tener esencialmente la misma función que los polipéptidos mencionados más arriba, que se ha descrito en la presente solicitud, o puede ser un mutante funcional de los mismos. En el contexto de las proteínas farmacéuticas tal como se describen en la presente solicitud para utilización en humanos, el destinatario experimentado percibirá que la secuencia principal de dichas proteínas y su patrón de glicosilación mimetizarán o, preferiblemente, serán idénticos a los de los humanos.

El término “homología” en relación con una secuencia de aminoácidos de la invención se puede utilizar para referirse a identidad o similitud, preferiblemente identidad. Como ya se ha indicado más arriba, un elevado grado de identidad de los aminoácidos puede limitarse a dominios o regiones funcionalmente significativos, por ejemplo, cualquiera de los dominios identificados en la presente solicitud.

En particular, la presente invención proporciona homólogos de las secuencias concretas de polipéptidos derivados de briofitas proporcionadas en la presente solicitud, como son mutantes, variantes, fragmentos y derivados de dichos homólogos. Estos homólogos se pueden obtener fácilmente haciendo uso de las divulgaciones hechas por la presente solicitud. Naturalmente el destinatario experimentado percibirá que están comprendidos en la presente invención los homólogos de las secuencias de proteínas glicosiladas *per se*, distintos de aquellos homólogos que, debido a la degeneración del código genético, dan lugar a secuencias de aminoácidos que son verdaderas copias (es decir idénticas al 100%) de las proteínas de mamíferos de interés y especialmente de las proteínas humanas de interés. Así pues, la presente invención también se extiende a los polipéptidos que incluyen secuencias de aminoácidos con función GalT como las que se han definido en la presente solicitud y como las que se pueden obtener haciendo uso de información sobre secuencias como la proporcionada por la presente solicitud. Al nivel de los aminoácidos, los homólogos de GalT pueden presentar homología, esto es, identidad, con las secuencias de aminoácidos que se describen en la técnica anterior como se ha descrito en la presente solicitud, es decir, bajo los números de entrada a la base de datos que se proporcionan en la sección de ejemplos, preferiblemente una homología de al menos aproximadamente un 50%, o al menos 55%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 65%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 88%, o una homología al menos aproximadamente 90% y, lo más preferiblemente, una homología al menos aproximadamente 95% o mayor, siempre que dichas proteínas tengan una actividad GalT que se ajuste al contexto de la presente invención.

En ciertos modos de realización, un alelo, variante, derivado, derivado mutante, mutante u homólogo de la secuencia específica puede mostrar poca homología global con la misma, digamos aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40%, o aproximadamente 45%. No obstante, en dominios o regiones funcionalmente significativos, la homología del aminoácido puede ser mucho mayor. Los dominios o regiones putativos funcionalmente significativos se pueden identificar mediante procesos de bioinformática, incluyendo la comparación de las secuencias de los homólogos.

Los dominios o regiones funcionalmente significativos de polipéptidos diferentes se pueden combinar para expresarse a partir de ácidos nucleicos codificantes como proteínas de fusión. Por ejemplo, se pueden combinar propiedades particularmente ventajosas o deseables de diferentes homólogos en una proteína híbrida, de tal modo que el producto de la expresión resultante, con función GalT, pueda contener fragmentos de diversas proteínas progenitoras, si resulta apropiado.

La similitud de las secuencias de aminoácidos puede ser como ha sido definido y determinado por el programa TBLASTN, de Altschul y otros (1990) *J. Mol. Biol.*, **215**:403-10, que se utiliza de forma estándar en la técnica. En particular, la versión 2.0 de TBLASTN se puede utilizar con matrices de sustitución BLOSUM62 y GAP, con pena-

ES 2 269 595 T3

alizaciones de gap: apertura: 11 y extensión: 1. Otro programa estándar que se puede utilizar es BestFit, que forma parte del Wisconsin Package, Versión 8, Septiembre de 1994 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711). BestFit realiza un alineamiento óptimo del segmento de mayor similitud entre dos secuencias. Los alineamientos óptimos se localizan insertando gaps (huecos) para maximizar el número de coincidencias utilizando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* (1981) 2: 482-489). Otros algoritmos incluyen GAP, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas, que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de gaps. Como con cualquier otro algoritmo, generalmente se utilizan los parámetros por defecto, que para GAP son una penalización por apertura del gap = 12 y una penalización por extensión del gap = 4. Alternativamente, se pueden utilizar una penalización por apertura del gap de 3 y una penalización por extensión del gap de 0,1. Otra alternativa adicional es el algoritmo FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988) *PNAS USA* **85**: 2444-2448).

La utilización de cualquiera de los términos “homología” y “homólogo” en la presente solicitud no implica ninguna relación evolutiva necesaria entre las secuencias comparadas, en consonancia con, por ejemplo, el uso estándar de expresiones como “recombinación de homólogos”, que requieren meramente que dos secuencias de nucleótidos sean suficientemente similares para recombinarse bajo condiciones apropiadas.

Debe entenderse que las aportaciones de todas las referencias citadas en la presente solicitud están incorporadas en las aportaciones de la descripción.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Material de Plantas

Se utilizó la variedad salvaje de *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. caracterizada por Reski y otros (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. *Mol Gen Genet* **244**, 352-359). Se trata de un subcultivo de la variedad 16/14 que fue recogida por H.L.K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire, UK y que fue propagada por Engel (1968) *Am J Bot* **55**, 438-446).

Construcción del pRT101VEGF C3

Se extrajo ADNc del factor 121 de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF₁₂₁) sin secuencia líder, como fragmento *NdeI-SalI* a partir de pCYTEXP-VEGF₁₂₁ (obtenido de GBF, Braunschweig, Alemania). A este fragmento se le dejaron los extremos romos mediante la reacción de Klenow y se introdujo en pRT101 (Töpfer y otros (1987) *NAR* **15**, 589) en el sitio de restricción *SmaI* para formar el plásmido pRT101VEGF C3. En esta construcción, se situó el ADNc del VEGF₁₂₁ sin secuencia líder aguas abajo del promotor CaMV 35S y se terminó mediante el terminador CaMV (Gorr (1999) *Biotechnologische Nutzung von Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. Tesis doctoral, Universidad de Hamburgo).

Construcción del pRT101TPVEGF C3

Se clonó la secuencia para el péptido señal VEGF (señal de clasificación para la secreción) en pRT101TPVEGF C3. El ADNc del péptido señal se amplificó a partir del plásmido pRT101 P21 (Gorr (1999), *supra*) utilizando el cebador 5' MoB323 5'-ATA CTC GAG GAA GAT GAA CTT TTC TGC CTG TCT TGG-3' (Identificador de secuencia n° 1) que contiene un sitio de restricción *XhoI* y el cebador 3' MoB349 5'-CTG CCA TGG GTG CAG CCT GGG ACC AC-3' (Identificador de secuencia n° 2) que contiene un sitio de restricción *NcoI*. El ADN amplificado fue digerido con *XhoI* y *NcoI* y ligado en pRT101VEGF C3 (digerido con *XhoI/NcoI*), dando como resultado pRT101TPVEGF C3. El plásmido resultante contenía las secuencias de codificación para el péptido señal VEGF y VEGF₁₂₁ en el marco bajo el control del promotor CaMV 35S.

Condiciones de cultivo estándar

Se crecieron plantas axénicamente bajo condiciones estériles en medio Knop modificado líquido inorgánico simple (1000 mg/l Ca(NO₃)₂ x 4H₂O 250 mg/l KCl, 250 mg/l KH₂PO₄, 250 mg/l MgSO₄ x 7 H₂O y 12,5 mg/l FeSO₄ x 7 H₂O; pH 5,8 (Reski y Abel (1985) *Planta* **165**, 354-358). Se hicieron crecer plantas en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 200 ml de medio de cultivo y los matraces se agitaron en un agitador Certomat R (B. Braun Biotech International, Alemania) ajustado a 120 rpm. Las condiciones en la cámara de crecimiento fueron de 25 +/- 3°C y un régimen de luz-oscuridad de 16:8 h. Los matraces se iluminaron desde la parte superior mediante dos tubos fluorescentes (Osram L 58 W/25) que proporcionan 35 micromoles⁻¹m⁻². Los cultivos se subcultivaron una vez a la semana mediante desintegración utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Alemania) e inoculación de dos nuevos matraces Erlenmeyer que contenían 100 ml de medio Knop fresco.

Aislamiento del protoplasto

Se preincubó musgo protonemata en 0,5 M de manitol después de la filtración. Pasados 30 minutos, se añadió a la suspensión Driselasa al 4% (Sigma, Deisenhofen, Alemania). La Driselasa se disolvió en 0,5 M de manitol (pH 5,6-

ES 2 269 595 T3

5,8), se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min y se esterilizó haciéndola pasar por un filtro de 0,22 micras (Millex GP, Millipore Corporation, USA). La suspensión, que contenía Driselasa al 1% (concentración final), se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente y se agitó suavemente (las mejores producciones de protoplastos se consiguieron después de 2 horas de incubación)(Schaefer, "Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens*", (Mayo de 2001) Institute of Ecology, Laboratory of Plant Cell Genetics, Universidad de Lausana Didier.Schaefer@ie-pc.unil.ch). La suspensión se hizo pasar a través de tamices (Wilson, CLF, Alemania) con tamaños de poro de 100 micras y 50 micras. La suspensión se centrifugó en tubos de centrifugación estériles y los protoplastos se sedimentaron a temperatura ambiente durante 10 min a 55 g (aceleración de 3; desaceleración a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro, Alemania)(Schefer, *supra*). Los protoplastos se resuspendieron cuidadosamente en un medio W5 (125 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 137 mM NaCl; 5,5 mM glucosa; 10 mM KCl; pH 5,6; 660-680 mOsm; filtrado estéril). La suspensión se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; desaceleración a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro, Alemania). Los protoplastos se resuspendieron cuidadosamente en un medio W5 (Rother y otros (1994) *J Plant Physiol* 143, 72-77). Se transfirió un pequeño volumen de la suspensión a una cámara Fuchs-Rosenthal para contar los protoplastos.

15 *Protocolo de transformación*

Los protoplastos se incubaron en hielo en la oscuridad durante 30 minutos para la transformación. Posteriormente, los protoplastos se sedimentaron mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 55 g (aceleración de 3; desaceleración a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro). Los protoplastos se resuspendieron en un medio 3M (15 mM CaCl₂ x 2H₂O; 0,1 % MES; 0,48 M manitol; pH 5,6; 540 mOsm; filtrado estéril, Schaefer y otros (1991) *Mol Gen Genet* 226, 418-424) a una concentración de 1,2 x 10⁶ protoplastos/ml (Reutter y Reski (1996) Production of a heterologous protein in birreactor cultures of fully differentiated moss plants, P1. Tissue culture and Biotech, 2, págs. 192-147). Se dispensaron 250 microlitros de esta suspensión de protoplastos en un nuevo tubo de centrifugación estéril, se añadió una solución de 50 microlitros de ADN (ADN purificado en columna en H₂O (Qiagen, Hilden, Alemania); 10-100 microlitros; cantidad óptima de ADN de 60 microgramos) y por último se añadieron 250 microlitros de solución de PEG (40% PEG 4000; 0,4 M manitol; 0,1 M Ca(NO₃)₂; pH 6 después de esterilización). La suspensión se mezcló inmediatamente pero cuidadosamente y, a continuación se incubó durante 6 min a temperatura ambiente mezclando con cuidado de cuando en cuando. La suspensión se diluyó progresivamente añadiendo 1, 2, 3 y 4 ml de un medio 3M. La suspensión se centrifugó a 20°C durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; desaceleración a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro). La pastilla se resuspendió

a) para experimentos de transformación temporal en 300 microlitros o 400 microlitros de un medio 3M. El cultivo de los protoplastos transformados se realizó en placas de 96 pocillos (300 microlitros, Nunclon, Nunc GmbH, Wiesbaden, Alemania) o placas de 48 pocillos (400 microlitros, Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania).

b) para transformación permanente en 3 ml de un medio de regeneración (medio Knop modificado; 5% glucosa; 3% manitol; 540 mOsm; pH 5,6-5,8). La regeneración y la selección se realizaron como describen Strepp y otros (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4368-4373). Para la selección se suplementaron los medios Knop bien con 50 microgramos/ml de G418 o con 30 microgramos/ml de Higromicina B.

La co-transformación se realizó transfiriendo 10 microgramos de pRT99 no digerido (Töpfer y otros (1988) Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells, *NAR* 16, 8725) que contiene el gen *npt II* como un marcador de selección, en paralelo con 10 microgramos de ADN linealizado de cada constructo de inactivación y/o de integración en los protoplastos.

Espectrometría de masas MALDI-TOF de glicanos de musgo

El material vegetal se cultivó en un cultivo líquido, se aisló mediante filtración, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Las bandas de proteína se eliminaron de los geles SDS-poliacrilamida teñidos con Coomassie. El material se depositó bajo hielo seco. Los análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF se llevaron a cabo en el laboratorio del Prof. Dr. F. Altmann, Glicobiology Division, Institut für Chemie, Universität für Bodenkultur, Viena, Austria.

Se digirieron con pepsina entre 0,2 y 0,9 gramos de peso fresco de *Physcomitrella patens*. A partir de la digestión se obtuvieron N-glicanos como describen Wilson y otros (2001). Esencialmente, los glicanos se separaron mediante el tratamiento con el péptido: N-glicosidasa A y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en un DYNAMO (Thermo BioAnalysis, Santa Fe, NM).

60 **Ejemplos**

1. *Clonación de la 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 a partir de Physcomitrella patens y análisis de las plantas inactivadas*

65 1.1 *Clonación del ADNc y ADN genómico para la GNTI*

Se obtuvo un fragmento de ADNc para la GNTI realizando dos ciclos de PCR con cebadores degenerados sobre el ADNc procedente de *P. patens* salvaje. Estos cebadores se crearon sobre la base de un alineamiento de pro-

ES 2 269 595 T3

presente en el constructo de inactivación. Las membranas se lavaron cuatro veces a diferentes concentraciones de SSC (siendo la etapa de lavado final 0,5xSSC, 0,1% SDS a 65°C) y se expusieron a rayos X (Kodak Bio-Max MS) a -80°C durante de 2 a 3 días.

5 El análisis Northern con la sonda [obtenida mediante PCR sobre el ADNc con los cebadores: 3RACEG1 (5'-TTATCCGACCTGAAGTTTGC-3', Identificador de secuencia nº 13) y GNT15R (5'-AGTTTCTATGGTATCTAACTGC-3', Identificador de secuencia nº 18) detectó el transcripto GNTI correcto solamente en la especie salvaje. La ausencia del transcripto correcto en las plantas inactivadas corrobora la ruptura del gen *gntI* en *P. patens*.

10 La expresión del gen de control L21 no se vio afectada en los transformantes.

1.5. Análisis Southern de las plantas transgénicas

15 Para el análisis de Southern blot se utilizaron 5 microgramos de ADN genómico. Para la detección del número de sitios de integración para la casete *nptII* se digirió el ADN genómico con PvuII que corta la casete *nptII* en dos fragmentos y se hibrida con la casete *nptII* como una sonda. Este análisis mostró que algunas plantas tienen un número muy alto de casetes de selección integrados mientras que la planta número 6 tiene una sola ocurrencia de integración. Las plantas número 4 y 8 tienen también un número reducido de integraciones: entre 4 y 5 por planta. En un segundo análisis de Southern, se digirió el ADN genómico con *EcoRI* y se hibridó con una sonda *gntI* localizada en el extremo 3' del gen, fuera de la región que se utilizó para formar el constructo de inactivación. En este caso se esperaba que las plantas transgénicas presentarían una banda que fuera mayor que la de las especies salvajes para el tamaño de la casete *nptII* (1500pb). Las especies salvajes tienen una señal única a 4500pb mientras las plantas transgénicas tienen las bandas de 6000pb u otras pero no contienen la banda de la especie salvaje, confirmando la ruptura del locus de la especie salvaje.

25 1.6 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe p.e., en Wilson y otros (2001) *Glycobiology* 11, 261-274). Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítotos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron tres plantas con la GNTI inactivada. Los N-glicanos de las plantas con la GNTI inactivada presentaron las mismas estructuras comparadas con las de las especies salvajes (tab. 1) confirmando que la inactivación génica fue exitosa únicamente a nivel molecular, pero no a nivel bioquímico. Por lo tanto, se asume que existe otro GNTI en *Physcomitrella patens*.

2. Clonación de la alfa 1,3-fucosiltransferasa de *P. patens* y análisis de las plantas inactivadas

2.1. Clonación del ADNc y ADN genómico para la alfa 1,3-fucosiltransferasa (alfa 1,3-FT)

40 Se obtuvo parte del ADNc para la alfa 1,3-FT realizando dos ciclos de PCR con cebadores degenerados sobre el ADNc procedente de *P. patens* salvaje. Estos cebadores se crearon sobre la base de un alineamiento de proteínas de las alfa 1,3-FTs conocidas procedentes de *Vigna radiata* y *Arabidopsis thaliana*. En el primer ciclo se utilizaron los cebadores FD4F (5'-TGGGCNGARTAYGAYATGATG-3', Identificador de secuencia nº 31) y FDR1 (5'-TGNGTNARNCCNADNGGRTADAT-3', Identificador de secuencia nº 32) y a continuación el producto de esta PCR se sometió a una PCR posterior con los cebadores FD4F y FD5R (5'-TGNACNGCNGCCATRTC-3', Identificador de secuencia nº 33). La segunda PCR dio como resultado un producto 510pb que fue clonado en pCR 4 TOPO y secuenciado desde ambos extremos.

50 Para obtener el extremo 5' ausente del ADNc, se realizó una RACE 5' con los cebadores: 5FT4 (5'-GTAA CATTGCGCATAATGG-3', Identificador de secuencia nº 34), 5FT5 (5'-CGATCATTATGCGCACCAC-3', Identificador de secuencia nº 35), Y 5FT6 (5'-GGAAATAAAAGCAGCTCC-3', Identificador de secuencia nº 36) que produjo 200pb adicionales de ADNc, aunque todavía sin la Met inicial. Por lo tanto, se realizó un segundo ciclo de RACE 5' a partir de la nueva secuencia con los cebadores: 5FT7 (5'-AGGGTGAATCTCCATAGCC-3', Identificador de secuencia nº 37), 5FT8 (5'-CATCTGCCTGACCCTCACC-3', Identificador de secuencia nº 38), Y 5FT9 (5'-GCCTT GAACACGCATGGC-3', Identificador de secuencia nº 39) que produjo un fragmento adicional de 150pb pero todavía sin el codón de iniciación. Por último, se realizó un tercer ciclo con los cebadores: 5FT9, 5FT10 (5'-CGATACAAC CAGCACAGG-3', Identificador de secuencia nº 40), y 5FT11 (5'-CTTCTCTAGCCATTCTGCC-3', Identificador de secuencia nº 41) que produjo 400pb adicionales de secuencia que contenían el codón de iniciación.

60 Para la obtención del extremo 3' ausente del ADNc se realizó respectivamente una RACE 3' con los cebadores: 3FT1 (5'-GCAGTGGAAGTTTAATGGTC-3', Identificador de secuencia nº 42) y 3FT2 (5'-TCGTTTCTAGCTC TAGTAGAC-3', Identificador de secuencia nº 43) que produjo un fragmento de aproximadamente 550pb con el codón de terminación y por último los 1711pb completos del ADNc para la alfa 1,3-FT (GenBank: ADNc parcial: AJ429145).

65 Los 3083pb correspondientes de la secuencia genómica se obtuvieron mediante la clonación del gen alfa 1,3-FT en tres fragmentos mediante PCR a partir del ADN genómico de la *P. patens* salvaje con los cebadores específicos: FTA9F (5'-ATGCTCCCAGCCCAAGAC-3', Identificador de secuencia nº 44) y FTA10R (5'-TGCTACTAGAGC

ES 2 269 595 T3

TAGAAACG-3', Identificador de secuencia nº 45), FT18F (5'-TAGGGAGTAAATATGAAGGG-3', Identificador de secuencia nº 46) y 5FT5 (5'-CGATCATTATGCGCACCAC-3', Identificador de secuencia nº 35), 3FT1 (5'-GCAGTG GAAGTTAATGGTC-3', Identificador de secuencia nº 42) y FTA12R (5'-TACTTCCAATTGAAGACAAGG-3', Identificador de secuencia nº 47) que se secuenció mediante paseo con cebador.

2.2 Creación del constructo de inactivación para la alfa 1,3-FT

Para crear el constructo de inactivación, se realizó una PCR sobre el ADN genómico con los cebadores: FT15F (5'-AATGTTCTGTGCCATGCG-3', Identificador de secuencia nº 48) y FT16R (5'-TGCTTCAAATGGGCTAGGG-3', Identificador de secuencia nº 49). El fragmento de 2156pb obtenido de este modo se clonó en el vector pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). La casete NptII se sintetizó mediante PCR con polimerasa correctora sobre el plásmido pRT101neo (Girke y otros 1998) con los cebadores: nptII/NdeI-F (5'-ATGCCATATGGCATGCCTGCAGGTCAAC-3', Identificador de secuencia nº 50) para generar un sitio de restricción NdeI y nptII/BstZ17I-R (5'-GCATGTATACG CATGCCTGCAGGTCATG-3', Identificador de secuencia nº 51) para generar un sitio BstZ17I. El producto de la PCR también se clonó en pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción NdeI y BstZ17I. Mediante esta restricción se cortó un fragmento de 195pb que contenía una parte del cuarto intrón y una parte del quinto exón del fragmento genómico alfa 1,3-FT y se reemplazó por la casete *nptII*.

Para la transformación de *P. patens*, el constructo de inactivación resultante se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *MssI*, y se utilizaron 25 microgramos para la transformación.

2.3 Preselección de las plantas transgénicas

Para la preselección de las plantas resistentes, se trataron pequeños fragmentos de gametóforos (1-5 mg) durante 30 min a 45°C en 75 mM Tris-HCl, pH 8, que contenía 20 mM (NH₄)₂SO₄ y 0,1% Tween 20, y se utilizaron 3 microlitros de este extracto para la PCR con los cuatro pares de cebadores siguientes: FT14F (5'-ACAAAGTTACATACTCGCG-3', Identificador de secuencia nº 52) y FTA12R (5'-TACTTCCAATTGAAGACAAGG-3', Identificador de secuencia nº 47) para detectar una ruptura del gen *ft* original, N1 (5'-TACCGACAGTGGTCCCAAAG-3', Identificador de secuencia nº 25) y N2 (5'-CCACCATGATATTCGCAAG-3', Identificador de secuencia nº 26) para detectar la presencia de la casete *nptII*, FT14F (5'-ACAAAGTTACATACTCGCG-3', Identificador de secuencia nº 52) y N3 (5'-TGTCGTGCTCCACCATGTT-3', Identificador de secuencia nº 28) para controlar la integración del transgén en el extremo 5', FTA12R (5'-TACTTCCAATTGAAGACAAGG-3', Identificador de secuencia nº 47) y N4 (5'-GTTGAG CATATAAGAAAC-3', Identificador de secuencia nº 29) para controlar la integración en el extremo 3'. Las plantas que produjeron los fragmentos esperados en todas y cada una de las cuatro reacciones de PCR se consideraron como inactivadas putativas y se seleccionaron para un análisis posterior.

Por último se eligieron 9 plantas para un análisis molecular y bioquímico posterior.

2.4 RT-PCR

Se aisló el ARN total del tejido del musgo con el equipo RNeasy (Qiagen, Alemania). Se realizó una PCR de transcripción inversa según el protocolo estándar. Para la RT-PCR se utilizaron los cebadores: FTA9F (5'-ATGCTCC CAGCCCAAGAC-3', Identificador de secuencia nº 44) y FTA10R (5'-TGTCTACTAGAGCTAGAAACG-3', Identificador de secuencia nº 45) localizados en la región central del ADNc de la alfa 1,3-FT. Utilizando estos cebadores se detectó un transcripto de 475pb únicamente en las especies salvajes mientras que ninguna de las plantas transgénicas dio lugar a ningún producto de PCR. La ausencia de un transcripto detectable con los cebadores localizados a ambos lados de la casete *nptII* integrados confirma que todas las plantas analizadas están inactivadas.

Se realizó una RT-PCR como control con los cebadores para la APS reductasa (Koprivova y otros (2002) J. Biol. Chem. 277, 32195-32201): R10 (5'-TCTTTCATATTCGGTGACG-3', Identificador de secuencia nº 53) y R11 (5'-CGACCACAACATTAGATCC-3', Identificador de secuencia nº 54), lo que amplificó un fragmento de 900pb de todas las plantas.

2.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe p.e., en Wilson y otros (2001), *supra*. Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítomos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron tres plantas inactivadas con el alfa 1,3-FT. No se pudieron detectar residuos de alfa 1,3-fucosa ligada al GlcNAc unido a Asn sobre los N-glicanos de las plantas inactivadas con el alfa 1,3-FT (tab. 1) confirmando que la inactivación de la alfa 1,3-fucosiltransferasa en *Physcomitrella patens* fue un completo éxito.

ES 2 269 595 T3

3. Clonación de la alfa 1,2-xilosiltransferasa procedente de *P. patens* y análisis de las plantas inactivadas

3.1. Clonación del ADNc y ADN genómico para la beta 1,2-xilosiltransferasa (beta 1,2-XT)

5 Se obtuvo parte del ADNc para la beta 1,2-XT realizando dos ciclos de PCR con cebadores degenerados sobre el ADNc procedente de *P. patens* salvaje. Estos cebadores se crearon sobre la base de un alineamiento de proteínas de las beta 1,2-XT conocidas procedentes de plantas. En el primer ciclo se utilizaron los cebadores XDF1 (5'-TG YGARGSN TAYTTYGGNAAYGG-3', Identificador de secuencia nº 55) y XDR1 (5'-GCNCKNAYCATYTCNC CRAAYTC-3', Identificador de secuencia nº 56) y a continuación el producto de esta PCR se sometió a una PCR posterior con los cebadores XDF2 (5'-GGNGGNGARAARYTNGARRANGT-3', Identificador de secuencia nº 57) y XDR1. La segunda PCR dio como resultado un producto de 610pb que se clonó en pCR 4 TOPO (Invitrogen, USA) y se secuenció desde ambos extremos.

15 Para la obtención del extremo 5' ausente del ADNc, se realizó una RACE 5' con los cebadores: 5XT1 (5'-TCCTCCTTCTCTGGGACC-3', Identificador de secuencia nº 58), 5XT2 (5'-AGCTCCAGTTGTGAAATATGG-3', Identificador de secuencia nº 59), y 5XT3 (5'-TTCTTCCTCATTTCTGTC-3', Identificador de secuencia nº 83) que produjo 360pb adicionales de ADNc, aunque todavía sin la Met inicial. Por lo tanto, se realizó un segundo ciclo de RACE 5' a partir de la nueva secuencia con los cebadores: 5XT4 (5'-CTTCCTTACCACACTAC-3', Identificador de secuencia nº 60), 5XT5 (5'-TAGCATGACTGTGTGGCC-3', Identificador de secuencia nº 61), y 5XT6 (5'-AAAGGCTTGAGTGTAGCC-3', Identificador de secuencia nº 62) que produjo un fragmento de 390pb adicionales que contenían el codón de iniciación.

20 Para obtener el extremo 3' ausente del ADNc se realizó respectivamente una RACE 3' con los cebadores: 3XT1 (5'-GCCTTTCTTGCACGGGTTG-3', Identificador de secuencia nº 63) y 3XT2 (5'-GGACATTCCAAATAATCCC-3', Identificador de secuencia nº 64) que produjo un fragmento de aproximadamente 940pb con el codón de terminación y por último los 2300pb completos del ADNc para la beta 1,2-XT (GenBank: 1788 pb correspondientes a la región de codificación: AJ429144). Los 2388pb de la secuencia genómica se obtuvieron mediante la clonación del gen beta 1,2-XT en tres fragmentos mediante PCR a partir del ADN genómico de la *P. patens* salvaje con los cebadores específicos: XT14F (5'-TTACGAAGCACACCATGC-3', Identificador de secuencia nº 82) y XT15R (5'-GTCCTGTAAATGCCTTGC-3', Identificador de secuencia nº 65), XT-M1F (5'-AGGTTGAGCAATCATATGGC-3', Identificador de secuencia nº 66), y 5XT2, 3XT1 y XT11R (5'-ATCCCAGAAATATCTGATCC-3', Identificador de secuencia nº 67) que se secuenció mediante paseos con cebador.

3.2 Creación del constructo de inactivación para la beta 1,2-XT

35 Para crear el constructo de inactivación, se realizó una PCR sobre el ADN genómico con los cebadores: XT12F (5'-TGTGAGGCGTTCTTTGGC-3', Identificador de secuencia nº 68) y XT11R (5'-ATCCCAGAAATATCTGATCC-3', Identificador de secuencia nº 67). El fragmento de 2066pb obtenido de este modo se clonó en el vector pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). La casete *NptII* se sintetizó mediante PCR con polimerasa correctora sobre el plásmido pRT101neo (Girke y otros 1998) con los cebadores: *nptII*/Sall-F (5'-ATGCGTTCGACGTCAACATGGTGGAGCACG-3', Identificador de secuencia nº 69) para generar un sitio de restricción *Sall* y *nptII*/NdeI-R (5'-GCATCATATGTCCTG-GATTTTGGTTTTAGG-3', Identificador de secuencia nº 70) para generar un sitio *NdeI*. El producto de la PCR también se clonó en pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *Sall*. A partir del plásmido con el ADN genómico, se cortó un fragmento de 380pb que contenía parte del segundo exón y parte del segundo intrón y se reemplazó por la casete *nptII*.

45 Para la transformación de *P. patens*, el constructo de inactivación resultante se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *SpeI*, y se utilizaron 25 microgramos para la transformación.

3.3 Preselección de las plantas transgénicas

50 Para la preselección de las plantas resistentes, se trataron pequeños fragmentos de gametóforos (1-5 mg) durante 30 min a 45°C en 75 mM Tris-HCl, pH 8, que contenía 20 mM (NH₄)₂SO₄ y 0,1% Tween 20, y se utilizaron 3 micro-litros de este extracto para la PCR con los cuatro pares de cebadores siguientes: XT-M1F (5'-AGGTTGAGCAATCA TATGGC-3', Identificador de secuencia nº 66) y XT13R (5'-ACGATCCAAAATCTGGACGC-3', Identificador de secuencia nº 71) para detectar una ruptura del gen *xt* original, N1 (5'-TACCGACAGTGGTCCCAAAG-3', Identificador de secuencia nº 25) y N2 (5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3', Identificador de secuencia nº 26) para detectar la presencia de la casete *nptII*, XT-M1F (5'-AGGTTGAGCAATCATATGGC-3', Identificador de secuencia nº 66) y N3 (5'-TGTCGTGCTCCACCATGTT-3', Identificador de secuencia nº 28) para controlar la integración del transgén en el extremo 5', XT13R (5'-ACGATCCAAAATCTGGACGC-3', Identificador de secuencia nº 71) y N4 (5'-GTTGAG CATATAAGAAAC-3', Identificador de secuencia nº 29) para controlar la integración en el extremo 3'. Las plantas que produjeron los fragmentos esperados en todas y cada una de las cuatro reacciones de PCR se consideraron como inactivadas putativas y se seleccionaron para un análisis posterior.

65 Por último se eligieron 9 plantas para un análisis molecular y bioquímico posterior.

ES 2 269 595 T3

3.4 RT-PCR

Se aisló el ARN total del tejido del musgo con el equipo RNeasy (Qiagen, Alemania). Se realizó una PCR de transcripción inversa según el protocolo estándar. Para la RT-PCR se utilizaron los cebadores: XT14F (5'-TTACGAAG CACACCATGC-3', Identificador de secuencia n° 82) y XT15R (5'-GTCCTGTAAATGCCTGC-3', Identificador de secuencia n° 65) localizados en la región central del ADNc de la beta 1,2-XT y en ambos lados de la casete *npt II*. Utilizando estos cebadores se detectó un transcrito de 290pb únicamente en las especies salvajes mientras que ninguna de las plantas transgénicas dio lugar a ningún producto de PCR. La ausencia del transcrito con los cebadores localizados a ambos lados de la casete *nptII* integrada confirma que todas las plantas analizadas están inactivadas.

Se realizó, una RT-PCR como control, con los cebadores para la APS reductasa (Koprivova y otros (2002), *supra*): R10 (5'-TCTTTCATTCGGTGACG-3', Identificador de secuencia n° 53) y R11 (5'-CGACCACAACAT TAGATCC-3', Identificador de secuencia n° 54), lo que amplificó un fragmento de 900pb de todas las plantas.

3.5 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe, p.e., en Wilson y otros (2001), *supra*). Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítomos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron tres plantas inactivadas con el beta 1,2 XT. No se pudieron detectar residuos de beta 1,2 xilosil ligados al residuo beta manosilo sobre los N-glicanos de las plantas inactivadas con el beta 1,2 XT (tab. 1) confirmando que la inactivación de la beta 1,2-xilosiltransferasa en *Physcomitrella patens* fue un completo éxito.

4. Clonación del ADNc para la beta 1,4-galactosiltransferasa humana

Se utilizó el ADNc de hígado humano (Invitrogen, USA) para aislar el ADNc de la beta 1,4-galactosiltransferasa (GalT, Genbank: X55415). Se amplificó un fragmento de ADN de 1,2 kb utilizando el cebador 5' GalTXh-F (5'-TTCTCGAGACAATGAGGCTTCGGGAGCCGCTC-3', Identificador de secuencia n° 72) que contiene un sitio de restricción *XhoI* y el cebador GalTXb-R (5'-GGTCTAGACTAGCTCGGTGCCGATGTCC-3', Identificador de secuencia n° 73) que contiene un sitio de restricción *XbaI* para la PCR con una mezcla de enzima Elongasa (Invitrogen, USA). El fragmento de 1,2 kb se clonó en pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). El fragmento se cortó de este vector con *XhoI* y *XbaI* y se clonó en pRT101 (Töpfer y otros (1987) NAR 15, 5890) digerido con *XhoI* y *XbaI*. El plásmido resultante pRT101-GalT contenía el ADNc de beta 1,4-galactosiltransferasa humana bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador CaMV.

5. Creación del constructo de inactivación para la beta 1,2-xilosiltransferasa y la integración de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana

A partir del ADN genómico de la *Physcomitrella patens* se amplificó un fragmento de 1,56 kb del gen de la beta 1,2-xilosiltransferasa utilizando el cebador XTB-F (5'-TTGGATCCTCAATTACGAAGCACACCATGC-3', Identificador de secuencia n° 74) y el cebador XTB-R (5'-TTGGATCCTCCTCCAGAAACATCTGATCCAG-3', Identificador de secuencia n° 75), ambos cebadores introdujeron sitios de restricción BamHI. El producto de la amplificación se clonó en pCR4 TOPO (Invitrogen, USA). El fragmento del gen de la beta 1,2-xilosiltransferasa clonado contenía un único sitio de restricción HindIII. En este sitio de restricción HindIII se introdujo mediante ligación el ADNc de la beta 1,4-galactosiltransferasa bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador CaMV, dando como resultado el plásmido pCR4-XTko-GalTki. La digestión del pCR4-XTko-GalTki con Bam HI produjo un fragmento que contenía el ADNc de la beta 1,4-galactosiltransferasa bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador CaMV flanqueados 5' y 3' por secuencias homólogas del gen de la beta 1,2-xilosiltransferasa de la *Physcomitrella patens*. Este fragmento se utilizó para experimentos de inactivación.

5.1 PCR

Para los análisis de PCR se utilizó ADN genómico aislado de plantas inactivadas putativas. Se localizaron los cebadores MoB 521 (5'-TTGCCGCTATCTACTTGTATGCTAACGT-3', Identificador de secuencia n° 76) y MoB 575 (5'-TGCCGTGGATGTGCTAGATAATCTT-3', Identificador de secuencia n° 77) en las secuencias homólogas a la beta 1,2-xilosiltransferasa en ambos lados de la casete beta 1,4-galactosiltransferasa. Se amplificó un fragmento de 339 pb procedente de especies salvajes correspondiente a la secuencia beta 1,2-xilosiltransferasa esperada. Se amplificó un fragmento de 2,1 kpb procedente de plantas inactivadas correspondiente a la casete beta 1,4-galactosiltransferasa introducida y no se pudo detectar ningún fragmento de 339 pb, confirmando la inactivación de la beta 1,2-xilosiltransferasa así como la integración de la casete beta 1,4-galactosiltransferasa.

5.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe, p.e., en Wilson y otros (2001), *supra*). Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítomos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron

tres plantas con inactivación beta 1,2-XT, e integración beta 1,4 GT. No se pudieron detectar residuos de beta 1,2 xilosil ligados al residuo de beta manosilo en los N-glicanos de estas plantas. El pico encontrado a 2235 en las especies salvajes que describe la estructura (GF)(GF)XF estaba desplazado en el patrón de los N-glicanos de las plantas transgénicas, confirmando la actividad de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana en *Physcomitrella patens*.

6. Creación del constructo de inactivación para la alfa 1,3-fucosiltransferasa e integración de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana

Se amplificó un fragmento de 2,66 kb del gen de la alfa 1,3-fucosiltransferasa procedente del ADN genómico de *Physcomitrella patens* utilizando el cebador FTB-F (5'-TAGGATCCAGATGATGTCTGCTCGGCAGAATGG-3', Identificador de secuencia nº 78) y el cebador FTB-R (5'-CTGGATCCTTGATAGATCCGAAGGTCTGAGTTCC-3', Identificador de secuencia nº 79), ambos cebadores introdujeron sitios de restricción *Bam*HI. El producto de la amplificación se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen, USA). El fragmento clonado del gen de la alfa 1,3-fucosiltransferasa contenía dos sitios de restricción *Hind*III. En estos sitios de restricción *Hind*III se introdujo mediante ligación el ADNc de la beta 1,4-galactosiltransferasa bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador CaMV, dando como resultado el plásmido pCR4-FTko-GalTki. La digestión del pCR4-FTko-GalTki con *Bam*HI dio como resultado un fragmento que contenía el ADNc de la beta 1,4-galactosiltransferasa bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador CaMV flanqueados 5' y 3', por secuencias homólogas al gen de la beta 1,3-fucosiltransferasa de la *Physcomitrella patens*. Este fragmento se utilizó para experimentos de inactivación.

6.1 PCR

Para los análisis de PCR se utilizó ADN genómico aislado de plantas inactivadas putativas. Se localizaron los cebadores MoB 435 (5'-TCCTACCTGCGGAGCAACAGATATTG-3', Identificador de secuencia nº 80) y MoB 495 (5'-GTGGACCCAGATTTGCTGGTGCACCTTG-3', Identificador de secuencia nº 81) en las secuencias homólogas a la alfa 1,3-fucosiltransferasa a ambos lados de la casete beta 1,4-galactosiltransferasa. Se amplificó un fragmento de 2 kpb procedente de especies salvajes correspondiente a la secuencia alfa 1,3-fucosiltransferasa esperada. Se amplificó un fragmento de 2,8 kpb procedente de plantas inactivadas correspondiente a la casete beta 1,4-galactosiltransferasa introducida y no se pudo detectar ningún fragmento de 2 kpb, confirmando la inactivación de la alfa 1,3-fucosiltransferasa así como la integración de la casete beta 1,4-galactosiltransferasa.

6.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe, p.e., en Wilson y otros (2001), *supra*. Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítomos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron tres plantas con inactivación de alfa 1,3 FT, e integración de beta 1,4 GT. No se pudieron detectar residuos de alfa 1,3 fucosil ligados al GlcNAc unido a Asn en los N-glicanos de estas plantas. El pico encontrado a 2235 en las especies salvajes que describe la estructura (GF)(GF)XF estaba desplazado en el patrón de los N-glicanos de las plantas transgénicas, confirmando la actividad de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana en *Physcomitrella patens*.

7. Generación de plantas con inactivaciones de la alfa 1,3-fucosiltransferasa y la beta 1,2-xilosiltransferasa e integración de la beta 1,4-galactosiltransferasa

Para la generación de plantas sin residuos alfa 1,3 fucosil y beta 1,2 xilosil y con residuos galactosil ligados a beta 1,4, se transformaron protoplastos derivados de protonema de *Physcomitrella patens* con los constructos descritos en los capítulos 5 y 6. A continuación, se pudo realizar la transformación así como la cotransformación con ambos constructos.

7.1 PCR

Para los análisis de PCR se realizaron los mismos procedimientos que los descritos en 5.1 y 6.1.

7.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Los N-glicanos de la *Physcomitrella patens* salvaje presentan unas características estructurales típicas de los N-glicanos de plantas como se describe, p.e., en Wilson y otros (2001), *supra*. Esto es, fucosa en ligamiento alfa 1,3 con el GlcNAc unido a Asn, xilosa en ligamiento beta 1,2 con el residuo beta manosilo, epítomos Lewis A (residuos alfa 1,4-fucosil y beta 1,3-galactosil ligados a GlcNAc) como elementos terminales no reductores (tab. 1). Se analizaron tres plantas transgénicas. No se pudieron detectar residuos de alfa 1,3 fucosil ligados al GlcNAc unido a Asn ni residuos beta 1,2 xilosil en los N-glicanos de estas plantas. El pico encontrado a 2235 en las especies salvajes describiendo la estructura (GF)(GF)XF se trasladó al pico masivo de 1665 en el patrón de los N-glicanos de las plantas transgénicas confirmando la actividad de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana en *Physcomitrella patens* así como la pérdida de los residuos fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2.

ES 2 269 595 T3

8.1 Purificación y análisis del VEGF₁₂₁ recombinante humano expresado en protoplastos *Physcomitrella* transformados temporalmente

5 Los protoplastos derivados del protonema de las plantas de *Physcomitrella* transgénicas que contienen beta 1,4-galactosiltransferasa humana y no contienen alfa 1,3-fucosiltransferasa ni beta 1,2-xilosiltransferasa (7.2) se transformaron con pRT101TPVEGF C3. El VEGF₁₂₁ expresado se segregó en el medio. Después de dos, tres y cuatro días, se recogió el medio de cultivo y se reemplazó por un medio fresco. Las muestras se filtraron mediante una unidad de filtrado Millex GP (Millipore) de 0,22 micras. Se purificó el VEGF₁₂₁ recombinante mediante FPLC (Aktaexplorer 100, Amersham Biosciences, Alemania) utilizando una columna de SP-Sefarosa (Amersham Biosciences, Alemania).
10 Se realizó una elución con cloruro de sodio en 25 mM de acetato de Na, pH 5,0. Las fracciones eluidas se concentraron mediante centrifugación utilizando dispositivos de filtrado Amicon Ultra, corte 10.000 (Millipore).

Se añadió a las muestras el tampón de carga SDS/PAGE, las proteínas se fraccionaron en SDS/PAGE conteniendo el 15% de acrilamida y el 0,4% de bisacrilamida. Los geles se tiñeron con Azul Brillante Coomassie R-250. Se eliminó la banda de VEGF₁₂₁ del SDS/PAGE teñido con Coomassie y se digirió con una secuencia de tripsina de secuenciación. Se separaron los glicanos mediante tratamiento con el péptido: N-glicosidasa A y se analizaron mediante espectrografía de masas MALDI-TOF en un DYNAMO (Thermo BioAnalysis, Santa Fe, NM).
15

El patrón de N-glicano detectado del VEGF₁₂₁ recombinante secretado fue similar al observado en las plantas de GalT transgénicas (con inactivaciones de FucT y XylT, véase 7.2), confirmando la actividad de la beta 1,4-galactosiltransferasa humana en *Physcomitrella patens* así como la pérdida de los residuos fucosil ligados a 1,3 y xilosil ligados a 1,2.
20

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 269 595 T3

TABLA 1

Estructuras de N-glicano de Physcomitrella patens salvajes (WT) y plantas inactivadas. Se aislaron los N-glicanos del material de las plantas que crecieron bajo las mismas condiciones (matraces de 500 ml, medio Knop modificado). F = residuo de fucosil, G = residuo de galactosil, Gn = residuo de N-acetilglucosaminil, M/Man = residuo de manosil, X = residuo de xilosil. (GF)(GF)XF representa el tipo de N-glicano más complejo, la denominada formación Lewis A

	WT	GNT1 Ko	FucT Ko	XylT Ko
M+ Na	Estructuras normales	Estructuras normales	Estructuras sin residuos alfa 1,3-fucosil	Estructuras sin residuos alfa 1,3-xilosil
933,8	Man3 (MM)	Man3 (MM)	Man3 (MM)	Man3 (MM)
1065,7	MMX	MMX	MMX	
1080,0	MMF	MMF		MMF
1096,0	Man4	Man4	Man4	Man4
1137,0	MGn/GnM	MGn/GnM	MGn/GnM	MGn/GnM
1212,1	MMXF	MMXF		
1227,8	Man4X	Man4X		
1258,4	Man5	Man5	Man5	Man5
1269,1	GnMX/MGnX	GnMX/MGnX	GnMX/MGnX	
1283,4				GnMF/MGnF
1299,2	Man4Gn	Man4Gn	Man4Gn	Man4Gn
1340,2	GnGn	GnGn	GnGn	GnGn
1415,5	GnMXF/MGnXF	GnMXF/MGnXF		
1420,2	Man6	Man6	Man6	Man6
1431,4	Man4GnX	Man4GnX	Man4GnX	
1445,3	Man4GnF	Man4GnF		Man4GnF
1472,1	GnGnX	GnGnX	GnGnX	
1486,4	GnGnF	GnGnF		
1577,4	GMXF/MGXP/ Man4GnXF	GMXF/MGXP/ Man4GnXF		
1582,4	Man7	Man7	Man7	Man7
1618,5	GnGnXF	GnGnXF		
1739,5	Man5GnXF	Man5GnXF		
1744,5	Man8	Man8	Man8	Man8
1780,4			(GF) GnX/Gn (GF) X	
1794,9				(GF) GnF/Gn (GF) F
1907,1	Man9	Man9	Man9	Man9
1926,7	(GF) GnXF/ Gn (GF) XF	(GF) GnXF/ Gn (GF) XF		
2068,8	Man9Glc1	Man9Glc1		
2088,9			(GF) (GF) X	
2102,8				(GF) (GF) F
2235,0	(GF) (GF) XF	(GF) (GF) XF		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula de briofita transformada que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y xilosil ligado a 1,2.
- 10 2. Una célula de briofita transformada según la reivindicación 1, donde dicha célula además comprende una secuencia de nucleótido ligada de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en dicha célula de briofita, donde dicha secuencia de nucleótido codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en la célula de briofita.
- 15 3. Una célula de briofita transformada según la reivindicación 2, donde dicho polipéptido glicosilado comprende patrones de glicosilación animales.
- 20 4. Una célula de briofita transformada según la reivindicación 3, donde dicho polipéptido glicosilado comprende patrones de glicosilación de mamíferos.
- 25 5. Una célula de briofita transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende una secuencia de nucleótido ligada de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en dicha célula de briofita, donde dicha secuencia de nucleótido codifica una galactosiltransferasa de mamífero funcional que se expresa en la célula de briofita.
- 30 6. Una célula de briofita transformada según la reivindicación 5, donde la galactosiltransferasa de mamífero que se expresa es una beta-1,4 galT.
- 35 7. Una célula de briofita transformada según la reivindicación 6, donde la galactosiltransferasa de mamífero que se expresa es una beta-1,4 galT humana.
- 40 8. Una célula de briofita según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la célula de briofita se elige de entre las especies del género *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*, *Ceratodon*, *Marchantia* y *Sphaerocarpos*.
- 45 9. Una célula de briofita según la reivindicación 8, donde la célula de briofita se elige de las *Physcomitrella*.
- 50 10. Una célula de briofita según la reivindicación 9, donde la célula de briofita procede de *Physcomitrella patens*.
- 55 11. Una célula de briofita según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína glicosilada de mamífero no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado que no es de mamífero.
- 60 12. Una célula de briofita según la reivindicación 11, donde el polipéptido glicosilado es un polipéptido humano.
- 65 13. Una célula de briofita según las reivindicaciones 11 ó 12, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por insulina humana, preproinsulina, VEGF, proinsulina, glucagón, interferones como por ejemplo interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factores de coagulación de la sangre elegidos entre Factor VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad, incluyendo la hormona luteinizante, la hormona estimuladora del folículo, factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor estimulante de colonias de granulocitos, prolactina, oxitocina, la hormona estimuladora de la tiroides, la hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, la hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO) y enzimas como, por ejemplo, betaglucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero y colágeno.
- 70 14. Un método para producir al menos una célula de briofita que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 ni xilosil ligado a 1,2, que comprende introducir en dicha célula i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos fucosiltransferasa endógena y ii) introducir en dicha célula una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos xilosiltransferasa endógena.
- 75 15. Un método según la reivindicación 14, donde dicha transformación de la célula de briofita comprende además una secuencia de nucleótidos ligada de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en dicha célula de briofita, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido glicosilado que se expresa en la célula de briofita.
- 80 16. Un método según la reivindicación 15, donde dicho polipéptido glicosilado comprende patrones de glicosilación animal.

ES 2 269 595 T3

17. Un método según la reivindicación 16, donde dicho polipéptido glicosilado comprende patrones de glicosilación de mamíferos.

18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que comprende además introducir en dicha célula una secuencia de ácidos nucleicos aislada que contiene un ácido nucleico ligado de modo que se pueda manipular a un promotor exógeno que guía la expresión en una célula de briofita, donde dicho ácido nucleico codifica un polipéptido de galactosiltransferasa de mamíferos funcional.

19. Un método según la reivindicación 18, donde la secuencia de nucleótidos de galactosiltransferasa es una secuencia de nucleótidos beta-1,4 galactosiltransferasa (beta-1,4 galT).

20. Un método según la reivindicación 19, donde la secuencia de nucleótidos de galactosiltransferasa es una secuencia de nucleótidos beta-1,4 galactosiltransferasa (beta-1,4 galT) humana.

21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína humana, una secuencia de aminoácidos primaria de un mamífero no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína que no es de mamífero.

22. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por insulina humana, preproinsulina, VEGF, proinsulina, glucagón, interferones como por ejemplo interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factores de coagulación de la sangre elegidos entre Factor VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad, incluyendo la hormona luteinizante, la hormona estimuladora del folículo, factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor estimulante de colonias de granulocitos, prolactina, oxitocina, la hormona estimuladora de la tiroides, la hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, la hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO) y enzimas como por ejemplo betaglucocebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, y proteínas humanas y no humanas elegidas entre amidasas, amilasas, carbohidrasas, celulasa, dextranasa, esterases, glucanasas, glucoamilasa, lactasa, lipasas, pepsina, peptidasas, fitasas, proteasas, pectinasas, caseína, proteínas de lactosuero, proteínas de soja, gluten y albúmina de huevo.

23. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, donde la célula de briofita se elige entre las especies del género *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*, *Ceratodon*, *Marchantia* y *Sphaerocarpos*.

24. Un método según la reivindicación 23, donde la célula de briofita se elige de las *Physcomitrella*.

25. Un método según la reivindicación 24, donde la célula de briofita procede de *Physcomitrella patens*.

26. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos primaria de polipéptido glicosilado humano, una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína glicosilada de mamífero no humano, una secuencia de aminoácidos primaria de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, y/o una secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido glicosilado que no es de mamífero.

27. Un método según la reivindicación 26, donde el polipéptido glicosilado es un polipéptido humano.

28. Un método según la reivindicación 26 ó 27, donde el polipéptido glicosilado se elige del grupo constituido por insulina humana, preproinsulina, VEGF, proinsulina, glucagón, interferones como por ejemplo interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factores de coagulación de la sangre elegidos entre Factor VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad, incluyendo la hormona luteinizante, la hormona estimuladora del folículo, factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor estimulante de colonias de granulocitos, prolactina, oxitocina, la hormona estimuladora de la tiroides, la hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, la hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas, como, por ejemplo, betaglucocebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero y colágeno.

29. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28, donde el promotor exógeno se elige entre promotores inducibles, regulados químicamente, constitutivos o específicos de la célula.

30. Un conjunto de vectores de ácidos nucleicos apropiados para la producción de al menos una célula de briofita transformada que comprende una doble inactivación de fucosiltransferasa y xilosiltransferasa que da como resultado glicanos ligados a N modificados sin residuos detectables de fucosil ligado a 1,3 y de xilosil ligado a 1,2, donde dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos comprende i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos fucosiltransferasa endógena y ii) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se dirige específicamente a una secuencia de nucleótidos de xilosiltransferasa endógena.

31. Un conjunto de vectores de ácidos nucleicos según la reivindicación 30, que incluye además un polinucleótido que codifica un polipéptido glicosilado.

ES 2 269 595 T3

32. Un conjunto de vectores de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 30 ó 31, que incluye además un polinucleótido que codifica una glicosiltransferasa de mamífero funcional para ser utilizado en un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29.

5 33. Un conjunto de vectores de ácidos nucleicos según la reivindicación 32, donde dicho polinucleótido codifica una galactosiltransferasa de mamífero.

34. Un conjunto de vectores de ácido nucleicos según la reivindicación 33, donde dicho polinucleótido codifica una beta-1,4 galactosiltransferasa humana.

10

35. Una célula hospedadora que contiene un conjunto de vectores de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34.

36. Una célula hospedadora según la reivindicación 35 que es una célula de briofita.

15

37. Una célula hospedadora según la reivindicación 35 que es una célula procariota.

38. Un método para la producción de una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, método que incluye la incorporación de dicho conjunto de vectores de ácidos nucleicos en la célula mediante transformación.

20

39. La utilización del conjunto de vectores de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34 en la producción de una célula de briofita transgénica.

40. Una célula hospedadora según las reivindicaciones 35 ó 36 que está comprendida en una briofita, o una parte de briofita, o un extracto o derivado de una briofita, o en un cultivo de células de briofita.

25

41. Una planta de briofita o un tejido de briofita que comprende una célula de briofita según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 36 y 40.

30

42. Un método para la producción de una planta de briofita, método que incluye la incorporación del conjunto de vectores de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34 en una célula de briofita y la regeneración de una briofita a partir de dicha célula.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 269 595 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> greenovation Biotech GmbH

5 <120> Mejoras en o relacionadas con la producción de proteínas

<130> Producción de proteínas

10 <140> 02028536.7

<141> 2002-12-20

<160> 83

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB323

<400> 1

30

atactcgagg aagatgaact tttctgcctg tcttgg

36

<210> 2

35 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB349

<400> 2

45

ctgccatggg tgcagcctgg gaccac

26

<210> 3

50 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)1

<400> 3

60

gtngcngcng tngtngtnat ggc

23

<210> 4

65 <211> 27

<212> ADN

ES 2 269 595 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)3	
	<400> 4	
10	ccyttrtang cngcnctgng gnacnc	27
	<210> 5	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)2	
	<400> 5	
25	tayaaratnc agncaytaya artgg	25
	<210> 6	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)4	
	<400> 6	
40	arrtaytgyt traaraaytg ncc	23
	<210> 7	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG3	
	<400> 7	
55	gtccgtgtcc aataaaggag	20
	<210> 8	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG4	

ES 2 269 595 T3

	<400> 8	
	gtcgggagag atttccatgt c	21
5	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG5	
15	<400> 9	
	ctaagatgac gacccttcgg	20
20	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG6	
30	<400> 10	
	catcctgaga aacaaaaagt gg	22
35	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG7	
45	<400> 11	
	agttacagac ttcaatgtac g	21
50	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG8	
60	<400> 12	
	aatcaggacg gttgcaagcc	20
65	<210> 13	
	<211> 20	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3RACEG1	
	<400> 13	
10	ttatccgacc tgaagttgc	20
	<210> 14	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3RACEG2	
	<400> 14	
25	gacctacaat tttggagagc	20
	<210> 15	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT5F	
	<400> 15	
40	tgggctttaa cacaactttt	20
	<210> 16	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT6R	
	<400> 16	
55	gccctaagct tgatccctg	19
	<210> 17	
60	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT21F	

ES 2 269 595 T3

	<400> 17	
	atggcagata tggctcgatt g	21
5	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT15R	
15	<400> 18	
	agtttctatg gtatctaact gc	22
20	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTHT7	
30	<400> 19	
	gagcatccaa gcttgacctg g	21
35	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTET7	
45	<400> 20	
	gcaccgtgaa ttctctagc tt	22
50	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTHT3	
60	<400> 21	
	ggaagaacaa gcttcaaagt ggc	23
65	<210> 22	
	<211> 21	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTPT3	
	<400> 22	
10	gatccctgcagatctcaaacg	23
	<210> 23	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT7F	
	<400> 23	
25	gttcsatggt ttgagcagg	19
	<210> 24	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT8R	
	<400> 24	
40	gcgaccttc ctattctcc	19
	<210> 25	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N1	
	<400> 25	
55	taccgacagt ggtcccaaag	20
	<210> 26	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N2	

ES 2 269 595 T3

	<400> 26	
	ccaccatgat attcggcaag	20
5	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT5F	
15	<400> 27	
	tgggctttaa cacaacttt	20
20	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N3	
30	<400> 28	
	tgctgtgctc caccatgtt	19
35	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N4	
45	<400> 29	
	gttgagcata taagaaac	18
50	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT1OR	
60	<400> 30	
	cacattgttc aattgatag ac	22
65	<210> 31	
	<211> 21	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FD4F	
	<400> 31	
10	tgggcngart aygayatgat g	21
	<210> 32	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FDR1	
	<400> 32	
25	tgngtnarnc cnadnggrta dat	23
	<210> 33	
30	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FD5R	
	<400> 33	
40	tgnacngcng ccatrtc	17
	<210> 34	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT4	
	<400> 34	
55	gtaacattcg cataatgg	18
	<210> 35	
60	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT5	

ES 2 269 595 T3

	<400> 35	
	cgatcattat gcgcaccac	19
5	<210> 36	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT6	
15	<400> 36	
	ggaataaaaa gcagctcc	18
20	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT7	
30	<400> 37	
	agggtgaatc tccatagcc	19
35	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT8	
45	<400> 38	
	catctgcctg accctcacc	19
50	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT9	
60	<400> 39	
	gccttgaaca cgcatggc	18
65	<210> 40	
	<211> 18	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT10	
	<400> 40	
10	cgatacaacc agcacagg	18
	<210> 41	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT11	
	<400> 41	
25	cttctctagc cattctgcc	19
	<210> 42	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3FT1	
	<400> 42	
40	gcagtgaag ttaatggtc	20
	<210> 43	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3FT2	
	<400> 43	
55	tcgtttctag ctctagtaga c	21
	<210> 44	
60	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA9F	

ES 2 269 595 T3

	<400> 44	
	atgctcccag cccaagac	18
5	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA10R	
15	<400> 45	
	tgtctactag agctagaaac g	21
20	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT18F	
30	<400> 46	
	tagggagtaa atatgaaggg	20
35	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA12R	
45	<400> 47	
	tactccaat tgaagacaag g	21
50	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT15F	
60	<400> 48	
	aatgttctgt gccatgcg	18
65	<210> 49	
	<211> 19	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT16R	
	<400> 49	
10	tgctcaaat gggctaggg	19
	<210> 50	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/NdeI-F	
	<400> 50	
25	atgcatatg gcatgcctgc aggtcaac	28
	<210> 51	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/BstZ17I-R	
	<400> 51	
40	gcatgtatac gcatgcctgc aggtcactg	29
	<210> 52	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT14F	
	<400> 52	
55	acaaagttac atactcgcg	19
	<210> 53	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador R10	

ES 2 269 595 T3

	<400> 53	
	tcttcacta ttcggtgacg	20
5	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador R11	
15	<400> 54	
	cgaccacaac attagatcc	19
20	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDF1	
30	<400> 55	
	tgygargsnt ayttyggnaa ygg	23
35	<210> 56	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDR1	
45	<400> 56	
	gcncknayca tytcncctaa ytc	23
50	<210> 57	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDF2	
60	<400> 57	
	gngngngara arytngarra ngt	23
65	<210> 58	
	<211> 18	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT1	
	<400> 58	
10	tcctccttct ctgggacc	18
	<210> 59	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT2	
	<400> 59	
25	agctccagtt gtgaaatag g	21
	<210> 60	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT4	
	<400> 60	
40	cttccttcac cacactac	18
	<210> 61	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT5	
	<400> 61	
55	tagcatgact gtgtggcc	18
	<210> 62	
60	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT6	

ES 2 269 595 T3

	<400> 62	
	aaaggcttga gtgtagcc	18
5	<216> 63	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3XT1	
15	<400> 63	
	gcctttcttg cacgggttg	19
20	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3XT2	
30	<400> 64	
	ggacattcca aataatccc	19
35	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT15R	
45	<400> 65	
	gtcctgttaa atgccttgc	19
50	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT-M1F	
60	<400> 66	
	aggttgagca atcatatggc	20
65	<210> 67	
	<211> 20	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT11R	
	<400> 67	
10	atcccagaaa tatctgatcc	20
	<210> 68	
15	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT12F	
	<400> 68	
25	tgtgagcgt tctttggc	18
	<210> 69	
30	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/SalI-F	
	<400> 69	
40	atgcgtcgac gtcaacatgg tggagcacg	29
	<210> 70	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/NdeI-R	
	<400> 70	
55	gcatcatatg tcaactggatt ttggttttag g	31
	<210> 71	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT13R	

ES 2 269 595 T3

	<400> 71	
	acgatccaaa atctggacgc	20
5	<210> 72	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GaITXh-F	
15	<400> 72	
	ttctcgagac aatgaggctt cgggagccgc tc	32
20	<210> 73	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GaITXb-R	
30	<400> 73	
	ggtctagact agctcgggtg cccgatgtcc	30
35	<210> 74	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XTB-F	
45	<400> 74	
	ttggatcctc aattacgaag cacacatgc	30
50	<210> 75	
	<211> 32	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XTB-R	
60	<400> 75	
	ttggatcctc ctcccagaaa catctgatcc ag	32
65	<210> 76	
	<211> 28	

ES 2 269 595 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB521	
	<400> 76	
10	ttgccgctat ctacttgat gctaacgt	28
	<210> 77	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB575	
	<400> 77	
25	tgccgtggat gtgctagata atctt	25
	<210> 78	
30	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTB-F	
	<400> 78	
40	taggatccag atgatgtctg ctggcagaa tgg	33
	<210> 79	
45	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTB-R	
	<400> 79	
55	ctggatcctt gtagatccga aggtctgagt tcc	33
	<210> 80	
60	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB435	

ES 2 269 595 T3

	<400> 80	
	tcttacctgc ggagcaacag atattg	26
5	<210> 81	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB495	
15	<400> 81	
	gtggaccag attgctggt gcacttg	27
20	<210> 82	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT14F	
30	<400> 82	
	ttacgaagca caccatgc	18
35	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT3	
45	<400> 83	
	ttcttctca ttctgtccc	19
50		
	LISTADO DE SECUENCIAS	
55	<110> greenovation Biotech GrnbH	
	<120> Mejoras en o relacionadas con la producción de proteínas	
	<130> Producción de proteínas	
60	<140> 02028536.7	
	<141> 2002-12-20	
65	<160> 83	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	

ES 2 269 595 T3

	<210> 1	
	<211> 36	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB323	
10	<400> 1	
	atactcgagg aagatgaact ttctgcctg tcttgg	36
15	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB349	
25	<400> 2	
	ctgccatggg tgcagcctgg gaccac	26
30	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)1	
40	<400> 3	
	gtngcngcng tngtngtnat ggc	23
45	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)3	
55	<400> 4	
	ccytttrtang cngcncctgng gnacnc	27
60	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)2	
5	<400> 5	
	tayaaratnc agncaytaya artgg	25
10	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT(d)4 4	
20	<400> 6	
	arrtaytyt traaraaytg ncc	23
25	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220> Cebador	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG3	
35	<400> 7	
	gtccgtgtcc aataaaggag	20
40	<210> 8	
	<211> 21	
	<212>ADN	
	<213>Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG4	
50	<400> 8	
	gtcgggagag atttccatgt c	2
55	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACEG5	
65	<400> 9	
	ctaagatgac gacccttcgg	20

ES 2 269 595 T3

	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACE6	
10	<400> 10	
	catcctgaga aacaaaaagt gg	22
15	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACE7	
25	<400> 11	
	agttacagac tcaatgtac g	21
30	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5RACE8	
40	<400> 12	
	aatcaggacg gttgcaagcc	20
45	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3RACEG1	
55	<400> 13	
	ttatccgacc tgaagttgc	20
60	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3RACEG2		
5	<400> 14		
	gacctacaat tttggagagc		20
10	<210> 15		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT5F		
20	<400> 15		
	tgggctttaa cacaactttt		20
25	<210> 16		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT6R		
35	<400> 16		
	gcctaagct tgatccctg		19
40	<210> 17		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT21F		
50	<400> 17		
	atggcagata tggctcgatt g		21
55	<210> 18		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT15R		
65	<400> 18		
	agtttctatg gtatctaact gc		22

ES 2 269 595 T3

	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTHT7	
10	<400> 19	
	gagcatccaa gcttgacctg g	21
15	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTET7	
25	<400> 20	
	gcacctgaa ttcttctagc tt	22
30	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTHT3	
40	<400> 21	
	ggaagaacaa gcttcaaagt ggc	23
45	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNTPT3	
55	<400> 22	
	gatccctgcagatctcaaacg	23
60	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT7F	
5	<400> 23	
	gttcsatggt ttgagcagg	19
10	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT8R	
20	<400> 24	
	gcgaccttc ctattctcc	19
25	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N1	
35	<400> 25	
	taccgacagt ggtcccaaag	20
40	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N2	
50	<400> 26	
	ccaccatgat attcgcaag	20
55	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT5F	
65	<400> 27	
	tgggctttaa cacaactttt	20

ES 2 269 595 T3

	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N3	
10	<400> 28	
	tgctgtgctc caccatgtt	19
15	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador N4	
25	<400> 29	
	gttgagcata taagaaac	18
30	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GNT10R	
40	<400> 30	
	cacattgttc aattgatag ac	22
45	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FD4F	
55	<400> 31	
	tgggngart aygayatgat g	21
60	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FDR1	
5	<400> 32	
	tgngtnarnc cnadnggrta dat	23
10	<210> 33	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FD5R	
20	<400> 33	
	tgnaengcng ccatrtc	17
25	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT4	
35	<400> 34	
	gtaacattcg cataatgg	18
40	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT5	
50	<400> 35	
	cgatcattat ggcaccac	19
55	<210> 36	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT6	
65	<400> 36	
	ggaataaaa gcagctcc	18

ES 2 269 595 T3

<210> 37
<211> 19
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT7
10
<400> 37

agggtgaatc tccatagcc 19
15

<210> 38
<211> 19
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT8
25
<400> 38

catctgctg accctcacc 19
30

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT9
40
<400> 39

gccttgaaca cgcattggc 18
45

<210> 40
<211> 18
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT10
55
<400> 40

cgatacaacc agcacagg 18
60

<210> 41
<211> 19
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 269 595 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5FT11		
5	<400> 41		
	cttctctagc cattctgcc		19
10	<210> 42		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3FT11		
20	<400> 42		
	gcagtggaag ttaatggc		20
25	<210> 43		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3FT2		
35	<400> 43		
	tcgtttctag ctctagtaga c		21
40	<210> 44		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA9F		
50	<400> 44		
	atgctcccag cccaagac		18
55	<210> 45		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA10R		
65	<400> 45		
	tgtctactag agctagaaac g		21

ES 2 269 595 T3

	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT18F	
10	<400> 46	
	tagggagtaa atatgaagg	20
15	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTA12R	
25	<400> 47	
	tactccaat tgaagacaag g	21
30	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT15F	
40	<400> 48	
	aatgttctgt gccatg	18
45	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT16R	
55	<400> 49	
	tgctcaaat gggctagg	19
60	<210> 50	
	<211> 28	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/NdeI-F		
5	<400> 50		
	atgccatatg gcatgcctgc aggtcaac		28
10	<210> 51		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/BstZ17I-R		
20	<400> 51		
	gcatgtatac gcatgcctgc aggtcactg		29
25	<210> 52		
	<211> 11		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FT14F		
35	<400> 52		
	acaaagttac atactcgcg		19
40	<210> 53		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador R10		
50	<400> 53		
	tcttcacta ttcggtgacg		20
55	<210> 54		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador R11		
65	<400> 54		
	cgaccacaac attagatcc		19

ES 2 269 595 T3

	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDF1	
10	<400> 55	
	tgygargsnt ayttygnaa ygg	23
15	<210> 56	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDR1	
25	<400> 56	
	gencknayca tytncraa ytc	23
30	<210> 57	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XDF2	
40	<400> 57	
	ggngngara arytngarra ngt	23
45	<210> 58	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT1	
55	<400> 58	
	tcctcctct ctgggacc	18
60	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT2		
5	<400> 59		
	agctccagtt gtgaaatag g		21
10	<210> 60		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT4		
20	<400> 60		
	cttccttcac cacactac		18
25	<210> 61		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT5		
35	<400> 61		
	tagcatgact gtgtggcc		18
40	<210> 62		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT6		
50	<400> 62		
	aaaggcttga gtgtagcc		18
55	<210> 63		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3XT1		
65	<400> 63		
	gcctttcttg cacgggttg		19

ES 2 269 595 T3

	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 3XT2	
10	<400> 64	
	ggacattcca aataatccc	19
15	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT15R	
25	<400> 65	
	gtcctgtaa atgccttgc	19
30	<210> 66	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT-M1F	
40	<400> 66	
	aggttgagca atcatatggc	20
45	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT11R	
55	<400> 67	
	atcccagaaa tatctgatcc	20
60	<210> 68	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT12F	
5	<400> 68	
	tgtgaggcgt tctttggc	18
10	<210> 69	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/SaII-F	
20	<400> 69	
	atgcgtcgac gtcaacatgg tggagcacg	29
25	<210> 70	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador nptII/NdeI-R	
35	<400> 70	
	gcatcatatg tctactggatt ttggttttag g	31
40	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT13R	
50	<400> 71	
	acgatccaaa atctggagcg	20
55	<210> 72	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GalTXh-F	
65	<400> 72	
	ttctcgagac aatgaggctt cgggagccgc tc	32

ES 2 269 595 T3

	<210> 73	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador GaITXb-R	
10	<400> 73	
	ggctagact agctcgggtg cccgatgtcc	33
15	<210> 74	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XTB-F	
25	<400> 74	
	ttgatcctc aattacgaag cacacatgc	30
30	<210> 75	
	<211> 32	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XTB-R	
40	<400> 75	
	ttgatcctc ctcccagaaa catctgatcc ag	32
45	<210> 76	
	<211> 28	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB521	
55	<400> 76	
	ttgccgctat ctactgtat gctaactg	28
60	<210> 77	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 269 595 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB575	
5	<400> 77	
	tgccgtggat gtgctagata atctt	25
10	<210> 78	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTB-F	
20	<400> 78	
	taggatccag atgatgtctg ctggcagaa tgg	33
25	<210> 79	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador FTB-R	
35	<400> 79	
	ctggatcctt gtgatccga aggtctgagt tcc	33
40	<210> 80	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB435	
50	<400> 80	
	tcctacctgc ggagcaacag atattg	26
55	<210> 81	
	<211> 27	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador MoB495	
65	<400> 81	
	gtggaccag atttgctggt gcacttg	27

ES 2 269 595 T3

<210> 82
<211> 18
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador XT14F
10
<400> 82

ttacgaagca caccatgc 18

15
<210> 83
<211> 19
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: secuencia de cebador 5XT3
25
<400> 83

ttcttctca ttctgtccc 19

30

35

40

45

50

55

60

65