



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 915**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04706631 .1**  
96 Fecha de presentación : **30.01.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1590464**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Transformación de plantas mediante ensamblaje en vivo de una secuencia de interés.**

30 Prioridad: **31.01.2003 DE 103 03 937**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.03.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.03.2010**

73 Titular/es: **ICON GENETICS GmbH**  
**Briennerstrasse 12A**  
**80333 München, DE**  
**ICON GENETICS, Inc.**

72 Inventor/es: **Giritch, Anatoly;**  
**Eliby, Serik;**  
**Marillonnet, Sylvestre;**  
**Klimyuk, Victor y**  
**Gleba, Yuri**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 334 915 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

Transformación de plantas mediante ensamblaje *in vivo* de una secuencia de interés.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para producir plantas transgénicas transformadas en un cromosoma. Además, la invención se refiere a un proceso para la selección de secuencias de nucleótidos para un fenotipo deseado en plantas. La invención se refiere también a plantas transgénicas y a bibliotecas de plantas o de semillas de plantas  
10 obtenidas u obtenibles de acuerdo con los procesos de la invención. Además, la invención se refiere a vectores para estos procesos y a plantas o células vegetales transformadas con los mismos.

**Antecedentes de la invención**

Los métodos utilizados actualmente para la transformación estable de plantas emplean normalmente la administración directa (bombardeo con microproyectiles, electroporación o tratamiento de protoplastos mediado por PEG, para una revisión ver: Gelvin, S.B., 1988, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 227-232; Hansen y Wright, 1999, *Trends Plant Sci.*, 4, 226-231) o la administración mediada por *Agrobacterium* de fragmento(s) de ADN de interés premanipulado(s) a las células vegetales. Las manipulaciones con dichos vectores de ADN *in planta* están restringidas con el fin de simplificar la resolución de patrones de integración complejos (US6114600; Srivastava y Ow, 2001, *Plant Mol. Biol.*, 46, 561-566; Srivastava y col., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11117-11121) o la eliminación de secuencias de ADN auxiliares de vectores integrados de manera estable en el ADN cromosómico. Los métodos de integración estable mediada por *Agrobacterium* de regiones de ADN-T en células vegetales utilizan el fragmento de ADN deseado completo flanqueado por secuencias limítrofes izquierda (LB) y derecha (RB) necesarias para la transferencia y la integración del ADN-T en el ADN cromosómico del huésped (US4940838; US5464763; EP0224287; US6051757; US5731179; WO9400977; EP0672752). En la mayoría de los casos, los procedimientos están dirigidos a la integración de una región específica de ADN-T en el ADN cromosómico. Se intentó también la cointegración de dos o más regiones de ADN-T diferentes (US4658082). Este último procedimiento se utiliza para segregar diferentes ADN-Ts en la progenie para fines diversos. Por ejemplo, Komari y colaboradores (US5731179) describen un método para transformar simultáneamente células vegetales con dos ADN-Ts, portando uno de ellos un marcador seleccionable funcional en plantas  
30 mientras que el otro ADN-T contiene un fragmento de ADN deseado para ser introducido en las células vegetales.

En general, las regiones de ADN diseñadas para integración estable en células vegetales son pre-construidas *in vitro* mediante el empleo de técnicas estándar de biología molecular (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press). Además, se utiliza la construcción *in vivo* en células bacterianas con el fin de, por ejemplo, ensamblar el vector binario con la ayuda de recombinación homóloga (US5731179). Las manipulaciones con ADN-T *in planta* están restringidas a regiones de ADN-T preintegradas en un cromosoma como es la eliminación de ciertas secuencias de ADN-T, por ejemplo secuencias que codifican marcadores seleccionables incluyendo genes que inducen una anomalía morfológica. La eliminación de fragmentos de ADN no deseados de las regiones del ADN-T tiene lugar con la ayuda de recombinación específica de sitio (WO9742334; Endo y col., 2002, *Plant J.*, 30, 115-122) o por medio de transposición (US5792924).

La recombinación específica de sitio ha sido utilizada para eliminar secuencias auxiliares de regiones de ADN-T. Aunque la escisión del ADN mediada por recombinasa/integrasa específica de sitio es más eficaz que la integración, es necesario realizar la selección por los acontecimientos de escisión, lo cual da lugar a una etapa adicional de cultivo de tejidos o de selección de la progenie por los acontecimientos de recombinación deseados. En resumen, todos los procesos de manipulación con ADN-Ts integrados de manera estable en los cromosomas vegetales son tediosos, inflexibles y en general están restringidos a una simple escisión (con menos eficacia que la integración) de los fragmentos de ADN deseados. Además, estos procesos están normalmente muy limitados en la diversidad combinatoria, ya que están restringidos a simples manipulaciones con un número limitado de genes y elementos reguladores conocidos.

Offringa y col. (*EMBO J.* (1990), 9, 3077-3084) han descrito un acontecimiento de recombinación homóloga extracromosómica entre dos ADN-Ts suministrados por *Agrobacterium* en células vegetales, seguido por la integración del producto de la recombinación en el ADN nuclear. La eficacia de recombinación homóloga extracromosómica entre los ADN-Ts coadministrados en la célula vegetal era sin embargo demasiado baja como para tener aplicaciones prácticas en la producción de vectores *in vivo* y se utilizó por tanto como un experimento control en estudios científicos del mecanismo de la recombinación homóloga en plantas (Offringa y col., 1990, *EMBO J.*, 9, 3077-3084; Tinland y col., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8000-8004; Puchta y col., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5055-5060). La frecuencia de recombinación homóloga seguida por la integración en el ADN cromosómico era del 1% aproximadamente de la frecuencia de cotransformación de la planta con dos ADN-Ts (Offringa y col., 1990, *EMBO J.*, 9, 3077-3084; Tinland y col., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8000-8004; Puchta y col., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5055-5060). Debido a la baja eficacia total de este proceso, no se han desarrollado aplicaciones prácticas de este método.

La frecuencia de integración vectorizada de ADN-T suministrado de manera transitoria a un sitio de IoxP pre-construido en plantas es también muy baja. Por ejemplo, Vergunst y colaboradores (1998, *Nucl. Acids Res.*, 26, 2729-2734) demostraron que la frecuencia de integración específica de sitio mediada por Cre de un fragmento de ADN-T de interés suministrado por *Agrobacterium* en una región de ADN-T genómica con un sitio de IoxP está en el rango

de 1,2-2,3% del número de acontecimientos de integración aleatorios. Debido a esta baja eficacia, tales procesos de integración requieren un ciclo adicional de selección y la utilización de cultivo de tejidos para recuperar las células portadoras de acontecimientos recombinantes. En contraste a esto, la frecuencia de re-ordenaciones de ADN cromosómico bicatenario con la ayuda de recombinasas específicas de sitio es significativamente más elevada y tiene lugar en el 29-100% de todas las células germinales de la planta (Zuo y col., 2001, *Nature Biotechnol.*, 19, 157-161; Luo y col., *Plant. J.*, 23, 423-430). Esto no es sorprendente, ya que las integrasas/recombinasas específicas de sitio requieren un sustrato de ADN bicatenario para el reconocimiento de los lugares de recombinación y la realización de la reacción de recombinación específica de sitio (Panigrahi y col., 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 5927-5935; Martin y col., 2002, *J. Mol. Biol.*, 19, 107-127; Thorpe y col., 2000, *Mol. Microbiol.*, 38, 232-241).

Todos los datos mencionados anteriormente sugieren que el ADN-T suministrado transitoriamente a la célula vegetal es un mal sustrato para las recombinasas específicas de sitio.

En una invención previa, nosotros hemos resuelto la baja eficacia anteriormente descrita mediante el ensamblaje de ARN-amplicones víricos mediado por re-combinación específica de sitio (W002/088369). Los amplicones víricos ensamblados eran capaces de una potente amplificación autónoma, célula a célula y movimiento sistémico y, por tanto, podrían amplificar potentemente los acontecimientos de recombinación poco frecuentes. Tales amplicones víricos fueron ensamblados *in planta* a partir de dos o más vectores mediante recombinación específica de sitio mediada por recombinasa y contenían un gen de interés para ser expresado transitoriamente con el objetivo de conseguir la expresión más potente posible del gen de interés en una planta que había sido infectada por dichos vectores. Sin embargo, la expresión del gen de interés era transitoria; no se abordó la transformación estable de cromosomas vegetales para obtener una expresión estable y heredable de un gen de interés.

Para muchas aplicaciones, los métodos descritos en W002/088369 no pueden ser, sin embargo, utilizados debido a los problemas siguientes: La amplificación y la propagación del amplicón vírico da lugar a síntomas de la enfermedad vírica que comprometen la salud de la planta. Por tanto, estos métodos no pueden ser utilizados para la determinación de la función génica (genómica funcional), ya que los síntomas de la enfermedad oscurecen frecuentemente la función del gen que va a ser determinada o impiden la expresión de la función que va a ser determinada. Además, la expresión de un gen de interés a partir de un amplicón da lugar a niveles de expresión elevados de forma no natural que producen fenotipos diferentes del fenotipo natural de ese gen, debido quizá a interacciones no naturales con las funciones de los genes nativos de esa planta.

Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar un proceso eficaz, rápido y muy versátil, para transformar una planta o células vegetales en un cromosoma, en particular un cromosoma nuclear, mediante lo cual pueden producirse plantas o células vegetales transgénicas genéticamente estables. Es otro objeto de la invención proporcionar un proceso para producir plantas transgénicas transformadas en un cromosoma, mediante el cual (por ejemplo para reducir el trabajo de clonaje) las secuencias de ADN que van a ser integradas en dicho cromosoma pueden ser producidas *in planta*. Es un objeto más proporcionar un proceso para transformar de manera estable plantas o células vegetales en un cromosoma con una secuencia de ADN interés que tenga efectos tóxicos sobre las bacterias utilizadas normalmente para el clonaje de dicha secuencia de ADN de interés. Es otro objeto de la invención proporcionar un proceso para la transformación genética del ADN nuclear vegetal, que permita la selección por la unidad de expresión óptima de un gen de interés. Es un objeto más proporcionar un proceso para la transformación estable de plantas o células vegetales en un cromosoma, mediante el cual pueden utilizarse vectores de manera modular, para reducir el trabajo de clonaje y el tamaño global de las moléculas de los vectores. Es otro objeto de la invención proporcionar un proceso para transformar de manera estable plantas o células vegetales en un cromosoma, por lo que dicho proceso permite la selección de bibliotecas de ADN por las funciones deseadas en las plantas. Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso *in planta* de transposición de elementos genéticos/fragmentos génicos, donde dicho proceso está ligado con un proceso para la transformación de manera estable de plantas o células vegetales con una secuencia de ADN de interés resultante de dicha transposición.

## Descripción general de la invención

Los objetos anteriores son conseguidos mediante un proceso de producción de plantas o células vegetales transgénicas transformadas en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés y capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés, comprendiendo dicho proceso:

(a) la provisión a células vegetales o plantas de al menos dos vectores diferentes, mediante lo cual

- (i) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que se recombinen entre sí mediante recombinación específica de sitio en dichas células vegetales con el fin de producir un producto de recombinación no replicante que contenga dicha secuencia de ADN de interés,
- (ii) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que integren dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma,
- (iii) dicha secuencia de ADN de interés contiene porciones de la secuencia de al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes, siendo dichas porciones de la secuencia necesarias para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés; y

(b) la selección de plantas o células vegetales que expresen dicha función de interés.

La invención proporciona además plantas transgénicas o partes de las mismas (como semillas) producidas o producibles mediante el proceso de la invención, según se define en la reivindicación 28. Además, se proporcionan bibliotecas de plantas o semillas de plantas obtenidas u obtenibles mediante este proceso. El proceso de la invención tiene muchas aplicaciones importantes, entre las cuales pueden mencionarse su utilización en procesos de selección de bibliotecas de ADN, en el análisis de la función génica y en genómica funcional, y en la evolución dirigida, incluyendo la transposición génica. Además, secuencias de ADN de interés complejas y/o grandes para ser introducidas en el cromosoma de una planta pueden ser ensambladas *in planta* a partir de precursores más pequeños (ver la Fig. 12). El proceso de la invención puede ser utilizado también, sin embargo, para introducir un gen que va a ser expresado en un cromosoma de una célula vegetal o de una planta. En una realización importante, todos los genes y/o secuencias codificadoras y/o secuencias expresables de dicha secuencia de ADN de interés integrada en un cromosoma son de origen vegetal, por lo que ninguna secuencia no natural puede pasar desde las plantas transgénicas de la invención a otros organismos.

Los inventores de esta invención han encontrado sorprendentemente que ADN-T administrado transitoriamente puede ser utilizado eficazmente para la producción *in planta* de una secuencia de interés para su integración en un cromosoma. Preferiblemente, la eficacia para conseguir acontecimientos de integración estable es comparable a la de una transformación estándar mediada por *Agrobacterium*. La razón de esta inesperadamente alta eficacia no ha sido todavía determinada. El proceso total de la invención es de suficiente eficacia para permitir aplicaciones rutinarias del proceso de la invención. Por ejemplo, puede llevarse a cabo por vez primera la selección de bibliotecas de ADN por un rasgo útil *in planta* con poco riesgo de perder miembros de la biblioteca que no sean compatibles con los sistemas procarióticos utilizados para el clonaje en los procedimientos tradicionales. Esto permite combinar los procesos de producción de vectores (por ejemplo para genómica funcional o para evolución dirigida) con la creación de transformantes estables, acelerando así significativamente el proceso de selección por combinaciones deseadas de elementos genéticos bajo ensayo.

El proceso de la invención permite producir plantas transgénicas o células vegetales transgénicas que están transformadas de manera estable en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés, donde dicha secuencia de ADN de interés deriva de al menos dos vectores diferentes. La transformación estable de un cromosoma significa la integración de dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma, de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés se replica junto con dicho cromosoma. Preferiblemente, dicha secuencia de ADN de interés puede ser heredada durante la división celular y la reproducción del organismo durante varias generaciones.

En la etapa (a) del proceso de la invención, se proporcionan a plantas o células vegetales al menos dos vectores diferentes, donde dichos al menos dos vectores diferentes son según se define más adelante. En la presente, “vectores diferentes” significa preferiblemente “tipos diferentes de vectores”. Puede proporcionarse a las células vegetales dichos al menos dos vectores diferentes en cultivo de tejidos, en particular en cultivo de tejidos de protoplastos de células vegetales. Además, pueden proporcionarse a explantes de una planta (por ejemplo explantes de raíces, discos de hojas) dichos al menos dos vectores diferentes. Además, pueden proporcionarse dichos vectores a plantas completas o a partes de plantas completas.

Dicha etapa de provisión (a) puede ser llevada a cabo mediante un método de transformación directa (por ejemplo, bombardeo de partículas, electroporación, transformación de protoplastos mediada por PEG) o mediante la administración de ADN-T mediada por *Agrobacterium*, prefiriéndose la administración de ADN-T mediada por *Agrobacterium* debido a su superior eficacia en el proceso de la invención. Dichos al menos dos vectores diferentes pueden ser proporcionados a dicha planta o a dichas células vegetales de forma consecutiva. Sin embargo, dicha provisión de dichos al menos dos vectores diferentes no está separada por un ciclo de reproducción de la planta transformada o por un ciclo de regeneración de una planta transformada con un vector seguido por la transformación con otro vector de dichos al menos dos vectores diferentes. Preferiblemente, a dicha planta o a dichas células vegetales se les proporcionan dichos al menos dos vectores en un procedimiento de una sola etapa. En el caso de la administración directa de los vectores, esto significa que en la etapa (a) se utilizan preferiblemente mezclas de dichos vectores. En el caso de la administración de ADN-T mediada por *Agrobacterium*, se utilizan preferiblemente mezclas de cepas (o células) de *Agrobacterium*, donde cada cepa o célula contiene un plásmido Ti diferente, conteniendo cada plásmido Ti un vector diferente de dichos al menos dos vectores diferentes. Muy preferiblemente, una cepa particular de *Agrobacterium* contiene un tipo de plásmido Ti que tiene un cierto vector, pero no plásmidos Ti conteniendo un vector diferente, mientras que otra cepa de *Agrobacterium* contiene otro tipo de plásmido Ti que tiene otro tipo de vector pero no plásmidos Ti que contienen un vector diferente. Esto es, ninguna célula de *Agrobacterium* proporciona más de un tipo de dichos al menos dos vectores diferentes. El proporcionar a dichas células vegetales o a dichas plantas dichos vectores en un procedimiento de una sola etapa, en particular de forma simultánea, es eficaz y proporciona una buena eficacia total del proceso de la invención.

Después de haber proporcionado a dichas plantas o a dichas células vegetales dichos al menos dos vectores diferentes, se forma en las células vegetales un producto de recombinación que contiene dicha secuencia de ADN de interés mediante recombinación específica de sitio entre al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes. Para este fin, cada uno de dichos al menos dos vectores diferentes es adaptado para que se recombine con al menos otro vector de dichos al menos dos vectores diferentes. Si se utilizan tres o más tipos de vectores diferentes, cada uno de ellos puede ser adaptado para que se recombine con cualquiera de los otros vectores. Para algunas aplicaciones, puede

ser sin embargo suficiente si cada vector de dichos al menos dos vectores diferentes está adaptado para recombinarse con uno de los otros vectores de dichos al menos dos vectores diferentes.

Dicha adaptación para la recombinación puede ser conseguida incluyendo sitio(s) de recombinación específica de sitio en dichos vectores para permitir dichas recombinaciones específicas de sitio. Preferiblemente, dicha recombinación específica de sitio es adaptada de tal manera que la reversión (esto es la reacción inversa) de dicha recombinación específica de sitio tenga lugar con una probabilidad baja. Esto puede conseguirse, por ejemplo, proporcionando el enzima para dicha recombinación de manera transitoria (por ejemplo, convirtiendo al gen de la recombinasa en no expresable por dicha recombinación). Más preferiblemente, se elige un sistema de sitios de recombinasa/recombinación específica de sitio que lleve a cabo recombinaciones irreversibles, lo cual puede ser conseguido mediante la utilización de una integrasa junto con los sitios de recombinación apropiados. Las integrasas utilizan dos sitios de recombinación diferentes (como AttP y AttB en el caso de la integrasa de PhiC31), lo cual permite una recombinación dirigida e irreversible.

Debe proporcionarse un gen de la recombinasa específica de sitio o de la integrasa compatible con los sitios de recombinación específica de sitio seleccionados (por ejemplo con uno de dichos al menos dos vectores diferentes), de tal manera que dicha recombinasa o integrasa pueda ser expresada. Preferiblemente, dicho gen de la recombinasa o integrasa es proporcionado en uno de dichos al menos dos vectores diferentes de tal manera que (i) pueda ser expresado antes del acontecimiento de recombinación específica de sitio y de tal manera que (ii) su expresión sea bloqueada después de que haya tenido lugar dicha recombinación. Alternativamente, las células vegetales o las plantas a las que se han proporcionado dichos al menos dos vectores diferentes en la etapa (a) pueden contener y expresar ya un gen que codifique una recombinasa o una integrasa.

Mediante dicha recombinación específica de sitio entre dichos al menos dos vectores diferentes, pueden formarse uno o más productos de recombinación diferentes, donde al menos un producto de recombinación contiene dicha secuencia de ADN de interés. Un producto de recombinación conteniendo dicha secuencia de ADN de interés no es replicante para evitar síntomas de la enfermedad debidos a una potente replicación de dicho producto de recombinación. Preferiblemente, todos los productos de recombinación son no replicantes. No replicante significa que el producto de recombinación no es un ácido nucleico vírico capaz de replicación autónoma, ya que esto produce generalmente síntomas de la enfermedad que son incompatibles con muchas aplicaciones como las determinaciones de la función génica. Muy preferiblemente, dicho producto de recombinación no codifica una replicasa vírica funcional que soporte la replicación del producto de recombinación.

Dicha secuencia de ADN de interés contiene porciones de las secuencias de al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes, donde dichas porciones de secuencias son necesarias para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Aunque la secuencia de ADN de interés puede contener tres o más porciones de las secuencias de tres o más vectores diferentes, la secuencia de ADN de interés contiene preferiblemente dos porciones de secuencias de dos vectores de dichos al menos dos vectores diferentes. La recombinación entre dichos al menos dos vectores diferentes puede tener como resultado la formación de más de un producto de recombinación. Al menos un producto de recombinación contiene dicha secuencia de ADN de interés. Pueden formarse otros productos de recombinación que no contengan dicha secuencia de ADN de interés.

Dicha secuencia de ADN de interés contiene porciones de secuencias de al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes. Al menos dos de dichas porciones de secuencias son necesarias para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Por tanto, dicha función de interés no puede ser expresada si se proporciona únicamente un vector a dichas células vegetales o a dichas plantas. Dicha secuencia de ADN de interés puede contener también, por supuesto, secuencias derivadas de dichos al menos dos vectores diferentes que no son necesarias para la expresión de dicha función de interés.

En una realización básica, a dicha planta o a dichas células vegetales se les proporcionan dos vectores diferentes y un producto de recombinación conteniendo dicha secuencia de ADN de interés es ensamblado a partir de estos dos vectores diferentes. Dicha secuencia de ADN de interés contendrá por tanto las dos porciones de las secuencias de estos dos vectores diferentes. En una realización más compleja, se proporcionan a dicha planta o a dichas células vegetales tres o más vectores diferentes, lo cual permite el ensamblaje de dos o más productos de recombinación que contienen cada uno de ellos una secuencia de ADN de interés diferente. Cada una de dichas dos o más secuencias de ADN de interés diferentes es ensamblada preferiblemente a partir de dos vectores diferentes. Esto permite la producción de dos o más plantas o células vegetales transgénicas diferentes, transformadas cada una de ellas en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés diferente. Como ejemplo, a dicha planta o a dicha célula vegetal se le pueden proporcionar tres (tipos de) vectores diferentes referidos como vector A, vector B y vector C, conteniendo dichos vectores las porciones de secuencias a, b y c, respectivamente. La recombinación específica de sitio entre el vector A y el vector B permite el ensamblaje de la secuencia de ADN de interés ab. La recombinación específica de sitio del vector A y el vector C permite el ensamblaje de la secuencia de ADN de interés ac. Por tanto, después de la segregación y/o selección, pueden obtenerse dos plantas transgénicas diferentes, una que está transformada en un cromosoma con la secuencia de ADN de interés ab y la otra que está transformada en un cromosoma con la secuencia de ADN de interés ac. Dependiendo de la colocación de los sitios de recombinación en estos tres vectores, pueden ensamblarse secuencias de ADN de interés adicionales (por ejemplo, secuencias de ADN de interés bc, ba, ca o cb) y por consiguiente pueden producirse plantas o células vegetales transgénicas adicionales, estando cada una de ellas transformada en un cromosoma con una de estas secuencias de ADN de interés.

Al proporcionar a las células vegetales o a las plantas muchos vectores diferentes, un gran número de secuencias de ADN de interés diferentes (por ejemplo docenas, cientos o incluso más secuencias de ADN de interés diferentes) pueden ser ensambladas e introducidas en un cromosoma para producir muchas plantas o células vegetales transgénicas diferentes. De esta forma pueden proporcionarse a plantas o a células vegetales bibliotecas de ADN. Las plantas o células vegetales transgénicas producidas de este modo pueden ser posteriormente sometidas a selección por un rasgo útil o por un fenotipo deseado. Es en tales métodos de selección donde puede hacerse uso del potencial completo de la presente invención.

Si se utilizan tres o más tipos de vectores diferentes en el proceso de la invención, cada vector puede ser adaptado para que se recombine con todos los demás vectores de dichos al menos dos vectores diferentes. En el ejemplo anterior con los vectores A, B y C, pueden formarse por tanto hasta seis secuencias de ADN de interés diferentes (ab, ac, bc, ba, ca y cb). En esta realización general, puede formarse la variedad combinatoria más grande de secuencias de ADN de interés (y por tanto de plantas transgénicas). En una realización más especial, puede utilizarse un vector primario mezclado con un conjunto de vectores secundarios. Pueden por tanto formarse diferentes secuencias de ADN de interés, conteniendo cada una de ellas una porción de la secuencia de dicho vector primario y una porción de la secuencia de un vector de dicho conjunto de vectores secundarios. El vector primario puede proporcionar por ejemplo secuencias que conviertan a las porciones de secuencias de los vectores secundarios en expresables después del ensamblaje de una secuencia de ADN de interés que contenga una porción de la secuencia de dicho vector primario y una porción de la secuencia de un vector de dicho conjunto de vectores secundarios.

Para la producción de plantas o células vegetales transgénicas que estén transformadas en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés, dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que integren dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma. Dicho cromosoma puede ser un cromosoma nuclear, un cromosoma plasmídico o un cromosoma mitocondrial. Se prefieren cromosomas nucleares y plasmídicos siendo el más preferido un cromosoma nuclear. Dicha adaptación para la integración depende del tipo de cromosoma. Para integrar dicha secuencia de ADN de interés en el cromosoma plasmídico, esto es el plasmoma, puede utilizarse por ejemplo recombinación homóloga. En este caso, dichos vectores y/o las porciones de secuencias respectivas son adaptados de tal manera que el producto de recombinación que contiene dicha secuencia de ADN de interés contenga también secuencias homólogas a las secuencias del plasmoma para permitir la integración de dicha secuencia de ADN de interés en el plasmoma. Las secuencias homólogas a las secuencias del plasmoma son elegidas preferiblemente de tal manera que la integración tenga lugar en un sitio deseado del plasmoma. Los métodos para la transformación de plasmomas están bien establecidos para varias especies vegetales, ver, por ejemplo, Svab y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8526-8530; Koop y col., 1996, *Planta*, 199, 193-201; Ruf y col., 2001, *Nat. Biotechnol.*, 19(9), 870-875; para una revisión ver Maliga, P., 2002, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 164-172; WO 02/057466.

La integración de una secuencia de ADN de interés en un cromosoma nuclear puede ser llevada a cabo mediante, por ejemplo, transformación dirigida a un sitio en un sitio de integración preconstruido utilizando recombinación específica de sitio. Alternativamente, dichos al menos vectores diferentes son adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés o dicho producto de recombinación no replicante contenga secuencias de homología que faciliten la integración de dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma mediante recombinación homóloga. Preferiblemente, sin embargo, la integración nuclear se lleva a cabo utilizando las secuencias limítrofes izquierda y derecha del ADN-T de *Agrobacterium* en dicha secuencia de ADN de interés (ver más adelante y los ejemplos). Para este fin, dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés en dicho producto de recombinación no replicante tiene secuencias limítrofes del ADN-T. Uno o todos de dichos al menos dos vectores diferentes pueden contener un gen funcional de autonomía de citoquininas, mientras que dicha secuencia de ADN de interés carece preferiblemente de un gen de autonomía de citoquininas funcional.

Una planta transgénica o las células vegetales transgénicas transformadas en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés son capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Las plantas o las células vegetales transgénicas producidas que no sean capaces de expresar una función o que expresen una función que no sea de interés, pueden ser eliminadas en la etapa (b) del proceso de la invención. En lo que respecta a dicha función de interés, el proceso de la invención no está limitado. Típicamente, dicha función de interés está codificada por una secuencia codificadora contenida en dicha secuencia de ADN de interés. Dicha función de interés puede ser una función del ADN, del ARN (en particular del ARN mensajero) o de una proteína codificada en dicha secuencia de ADN de interés. Preferiblemente, dicha función de interés es una función del ARN o de una proteína codificada en dicha secuencia de ADN de interés y la expresión de dicha función requiere la transcripción de una secuencia codificadora que está en dicha secuencia de ADN de interés. Si dicha función es una función de una proteína codificada en dicha secuencia de ADN de interés, la expresión de dicha función requiere la transcripción y la traducción de una secuencia codificadora de dicha secuencia de ADN de interés. Para dicha transcripción y, opcionalmente, para dicha traducción, la secuencia de ADN de interés deberá contener los elementos de control necesarios para ello, como un promotor, una región 5' no traducida, una región 3' no traducida y/o una señal de poliadenilación, etc. Dicha función de interés puede ser, por ejemplo, resistencia a un antibiótico que puede ser utilizada para dicha selección de la etapa (b). Más de una función de interés puede ser expresada a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Dicha función de interés está normalmente relacionada con la razón para realizar el proceso de la invención. Típicamente, un marcador seleccionable utilizado en la etapa (b) de la invención está entre las funciones de interés que pueden ser expresadas a partir de dicha secuencia de ADN de interés.

Al menos dos porciones de las secuencias de al menos dos vectores diferentes son necesarias para expresar dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Dicha función de interés se hace expresable por el ensamblaje de dicha secuencia de ADN de interés mediante recombinación dirigida a un sitio entre al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes. Existen varias posibilidades de cómo hacer que dicha función de interés sea expresable de acuerdo con la invención:

Dicho ensamblaje de dicha secuencia de ADN de interés puede, por ejemplo, someter a una secuencia codificadora que codifique dicha función de interés al control de un elemento regulador (por ejemplo un promotor) necesario para la expresión de dicha secuencia codificadora. De este modo, puede formarse una unidad de expresión funcional en dicha secuencia de ADN de interés mediante dicho ensamblaje. Esta posibilidad es particularmente preferida si el proceso de la invención es utilizado para someter a selección un gran número de secuencias de ADN, como una colección de secuencias de ADN (por ejemplo una biblioteca), por un rasgo útil. Dicha colección de secuencias de ADN puede estar compuesta, por ejemplo, por formas mutadas de manera diferente de una secuencia codificadora de una proteína elegida, donde dichas formas mutadas de manera diferente pueden ser producidas por ejemplo mediante la introducción de mutaciones aleatoriamente (por ejemplo mediante PCR susceptible de error o mediante transposición génica), y una proteína mutante codificada por dicha secuencia codificadora elegida que tenga propiedades deseadas puede ser identificada con el proceso de la invención. En tal proceso de selección, un vector primario puede proporcionar dicha(s) secuencia(s) reguladora(s) requerida(s) para la expresión de una secuencia de ensayo a partir de dicha biblioteca y un conjunto de vectores secundarios conteniendo cada uno de ellos una secuencia de ensayo diferente. De esta forma, puede producirse un conjunto de células vegetales transgénicas o de plantas transgénicas conteniendo cada una de ellas una secuencia de ADN de interés diferente, por lo que estas plantas o células vegetales diferentes pueden ser sometidas a selección por una función de interés útil (un rasgo de interés útil) codificada por una de dichas secuencias de ensayo.

Alternativamente, el proceso de transposición puede ser realizado *in planta* durante el proceso de ensamblaje mediado por recombinación específica de sitio de dicha secuencia de ADN de interés. Según se muestra en la Figura 1B, las familias de vectores A<sub>n</sub> y B<sub>n</sub> pueden ser bibliotecas de diferentes variantes de dominios estructurales/funcionales de una proteína de interés. La unión de dichos dominios mediante recombinación específica de sitio puede crear una diversidad combinatoria de la proteína de interés generada *in planta*. Las secuencias codificadoras de la proteína de interés diversificada son integradas de manera estable en el ADN cromosómico de la planta. Una representación esquemática de un vector muy adecuado para tal transposición está mostrada en la Figura 11.

Otra realización importante permite la selección por secuencias reguladoras óptimas (por ejemplo un promotor) para expresar de manera óptima (en cualquier sentido) una secuencia codificadora elegida. En este caso, un vector primario puede proporcionar dicha secuencia codificadora y se proporciona un conjunto de secuencias reguladoras diferentes con un conjunto de vectores secundarios. Varias plantas o células vegetales transgénicas que contienen diferentes secuencias de ADN de interés pueden ser sometidas a selección y puede encontrarse un elemento regulador adecuado para expresar dicha secuencia codificadora elegida.

En una realización adicional, dicho ensamblaje de dicha secuencia de ADN de interés puede reunir fragmentos de una secuencia codificadora que codifique una función de interés que va a ser expresada. Preferiblemente, dos fragmentos de una secuencia codificadora son puestos en contacto mediante dicho ensamblaje, por lo que se proporciona a cada fragmento una porción de secuencia diferente de un vector diferente. Preferiblemente, cada fragmento de dicha secuencia codificadora no es capaz de expresar dicha función de interés en ausencia del otro fragmento. Esto puede ser dividiendo fácilmente dividiendo una secuencia codificadora en dos fragmentos, de tal manera que cada fragmento contenga una porción necesaria para la expresión de la función de interés. Dichos dos fragmentos pueden ser luego introducidos en un vector, por lo que se forman dos vectores diferentes de acuerdo con esta invención. Cada porción de secuencia puede proporcionar alguna de las secuencias reguladoras requeridas para la expresión de dicha secuencia codificadora a partir de dicha secuencia de ADN de interés ensamblada.

Para convertir en expresable dicha secuencia codificadora, la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés puede comprender un ajuste en *cis* mediado por un intrón. Dicho ensamblaje puede unir simultáneamente un intrón, en particular un intrón de autoayuste, de tal manera que el ajuste de un producto de expresión ARN de dicha secuencia codificadora tenga como resultado un ARNm que tenga ambos fragmentos conectados apropiadamente entre sí, de tal manera que una proteína deseada pueda ser traducida correctamente (por ejemplo según está representado en las Figs. 10 y 11). Con más detalle,

- un primer vector de dichos al menos dos vectores diferentes puede contener una primera porción de secuencia que contenga: una primera parte de una secuencia codificadora de la función que va a ser expresada y, corriente abajo de la misma, la parte 5' de un intrón, y
- un segundo vector de dichos al menos dos vectores diferentes puede contener una segunda porción de secuencia que contenga: una segunda parte de una secuencia codificadora de la función que va a ser expresada y, corriente arriba de la misma, la parte 3' de un intrón.

Esta importante realización está también ilustrada en los ejemplos.

En la etapa (b) del proceso de la invención, se seleccionan plantas o células vegetales transgénicas que expresen dicha función de interés. Dicha selección puede comprender la aplicación de un antibiótico o de un inhibidor adecuado para dicho marcador seleccionable a las células vegetales o a las plantas obtenidas en la etapa (a). Dicha selección puede comprender también la selección de plantas o células vegetales transformadas en las cuales haya tenido lugar la recombinación entre al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes. Además, dicha selección comprende preferiblemente la selección por la integración de dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma. La etapa (b) puede comprender también el permitir la segregación de células vegetales transformadas de manera diferente, en particular de células vegetales que contengan secuencias de ADN de interés diferentes (por ejemplo ensambladas de forma diferente). Dicha selección, y opcionalmente dicha segregación, puede comprender la utilización de un gen marcador seleccionable en, por ejemplo, dicha secuencia de ADN de interés. Para este fin, dichos al menos dos vectores diferentes pueden ser adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés contenga un gen marcador seleccionable u otra secuencia que permita la selección por plantas o células vegetales transformadas que contengan dicha secuencia de ADN de interés.

La etapa (b) puede ser llevada a cabo por muchas realizaciones diferentes. Una porción de la secuencia de uno de dichos al menos dos vectores diferentes puede contener un marcador seleccionable, donde dicho marcador seleccionable es incluido en dicha secuencia de ADN de interés mediante dicho ensamblaje. En una realización muy preferida, dicho marcador seleccionable es activado mediante dicho ensamblaje de dicha secuencia de ADN de interés, de tal manera que proporcione resistencia a un antibiótico a las células vegetales que contengan dicha secuencia de ADN de interés ensamblada pero que no proporcione resistencia a un antibiótico a las células en las cuales no haya tenido lugar dicho ensamblaje. Muy preferiblemente, el gen marcador seleccionable no puede ser transcrito en dichas células vegetales a partir de uno de dichos al menos dos vectores diferentes. Esta realización puede ser llevada a cabo de tal manera que dicho marcador seleccionable esté colocado bajo el control de un elemento genético, permitiendo la transcripción de dicho gen marcador seleccionable después de dicho ensamblaje de dicha secuencia de ADN de interés, por ejemplo colocando la secuencia codificadora de dicho marcador seleccionable bajo el control de un promotor. De manera ventajosa, un elemento IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) puede controlar la traducción de dicho marcador seleccionable (cf. Fig. 11). Más adelante se dan referencias que describen la utilización de los elementos IRES.

En una importante realización adicional, dichas plantas o células vegetales transgénicas son seleccionadas por la ausencia de uno o de todos los dichos al menos dos vectores diferentes y/o por la ausencia de productos de recombinación de los mismos, con la excepción de los productos de recombinación que contengan dicha secuencia de ADN de interés. Con esta realización, puede evitarse la producción de plantas o células vegetales transgénicas que contengan secuencias de ADN foráneas innecesarias derivadas de dichos al menos dos vectores diferentes. Estas secuencias de ADN foráneas innecesarias pueden alterar la expresión de dicha secuencia de ADN de interés o pueden comprometer la determinación de dicha función de interés (por ejemplo en estudios de genómica funcional). Esta realización puede ser llevada a cabo con la utilización de un marcador contraseleccionable. Opcionalmente, dicha selección puede ser apoyada mediante un análisis de PCR y la selección de los transformantes adecuados. Al menos uno de dichos al menos dos vectores diferentes puede contener un gen marcador contraseleccionable u otra secuencia que permita una selección eficaz frente a las células transformadas que contengan uno de dichos al menos dos vectores diferentes. Preferiblemente, dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados de tal manera que, después de dicha recombinación, dicho gen marcador contraseleccionable esté contenido en productos de recombinación distintos de las moléculas de ácido nucleico que contienen dicha secuencia de ADN de interés. Dicho gen marcador contraseleccionable o dicha otra secuencia que permite la selección eficaz frente a las células transformadas que contienen uno o más de dichos al menos dos vectores diferentes puede estar de manera ventajosa bajo el control traduccional del elemento denominado sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

La invención proporciona también plantas transgénicas o partes de las mismas, como semillas, producidas mediante el proceso de la invención. Preferiblemente, todas las secuencias codificadoras y/o las secuencias expresables de dicha secuencia de interés en dichas plantas transgénicas o partes de las mismas son de origen vegetal. Además, se proporcionan bibliotecas de plantas, de células vegetales o de semillas de plantas obtenidas u obtenibles de acuerdo con el proceso de la invención.

## 55 Realizaciones preferidas de la invención

Un proceso para la producción de plantas multicelulares o de células vegetales transgénicas transformadas de manera estable en un cromosoma nuclear con una secuencia de ADN de interés y que son capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés, comprendiendo dicho proceso:

- (a) la provisión a células vegetales o a plantas de al menos dos vectores diferentes mediante administración mediada por *Agrobacterium*, donde
  - (i) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que se recombinen entre sí mediante recombinación específica de sitio en dichas células vegetales para producir un producto de recombinación no replicante que contiene dicha secuencia de ADN de interés,

(ii) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que integren dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés contenga secuencias limítrofes de ADN-T,

(iii) dicha secuencia de ADN de interés contiene porciones de la secuencia de al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes, siendo necesarias dichas porciones de las secuencias para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés; y

(b) la selección de plantas o células vegetales que expresen dicha función de interés.

Un proceso para producir plantas multicelulares transgénicas o células vegetales transgénicas diferentes transformadas en un cromosoma, preferiblemente en un cromosoma nuclear, con una secuencia de ADN de interés y capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés, comprendiendo dicho proceso las etapas (A) y (B) siguientes:

(A) la provisión a plantas o a células vegetales de una mezcla de

(i) un vector primario que tenga una porción de secuencia primaria  $a_1$  y

(ii) un conjunto de  $n$  vectores secundarios, teniendo cada uno de ellos una porción de secuencia secundaria seleccionada del conjunto  $(b_1, b_2, \dots, b_n)$ ,

donde

$n$  es un número entero  $>1$ ,

dicha porción de secuencia primaria  $a_1$  es necesaria para expresar la función de la porción de secuencia secundaria  $(b_1, b_2, \dots, b_n)$

dicho vector primario y dichos vectores secundarios son adaptados de tal manera que dicho vector primario pueda recombinarse con todos los miembros de dicho conjunto de  $n$  vectores secundarios mediante recombinación específica de sitio para producir productos de recombinación que contengan diferentes secuencias de ADN de interés del tipo  $(a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_1b_n)$  o del tipo  $(b_1a_1, b_2a_1, \dots, b_na_1)$ ,

dicho vector primario y dichos vectores secundarios son adaptados para que integren dichas secuencias de ADN del tipo  $(a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_1b_n)$  o del tipo  $(b_1a_1, b_2a_1, \dots, b_na_1)$  en un cromosoma,

(B) la selección de las plantas o células vegetales transformadas que expresen una función de interés, preferiblemente a partir de una secuencia de ADN de interés del tipo  $(a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_1b_n)$  o del tipo  $(b_1a_1, b_2a_1, \dots, b_na_1)$ .

Dichas plantas multicelulares transgénicas diferentes difieren *inter alia* en que contienen diferentes secuencias de ADN de interés. Dichos productos de recombinación que contienen secuencias de ADN de interés pueden ser replicantes o no replicantes. Preferiblemente, son no replicantes según se definió en la descripción general de la invención. Dicha mezcla de vectores primario y secundarios es proporcionada preferiblemente a dichas células vegetales por una mezcla de células de *Agrobacterium*, proporcionando cada célula un tipo de vector.

## Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el esquema general del ensamblaje *in planta* de una secuencia de ADN de interés diseñada para su integración estable en el ADN cromosómico de la planta. RS significa sitios de recombinación.

La Fig. 1A muestra esquemáticamente el ensamblaje de una secuencia de ADN de interés a partir de dos vectores (precursores).

I - ensamblaje de una secuencia de ADN de interés (AB) a partir de dos vectores diferentes (A y B) mediante recombinación específica de sitio.

II - ensamblaje de una secuencia de ADN de interés (AB) a partir de dos vectores precursores (AA' y B'B) que incluyen secuencias cooperadoras (A' y B') ausentes en dicha secuencia de ADN de interés (AB).

Fig. 1B - muestra esquemáticamente el ensamblaje de una secuencia de ADN de interés a partir de más de dos vectores diferentes.

## ES 2 334 915 T3

I - ensamblaje de una secuencia de ADN de interés que tiene dos componentes ( $A_n B_n$ ) procedentes de una biblioteca de los vectores precursores A y B, donde n es el número de vectores precursores de la biblioteca.

II - ensamblaje de los tres componentes de la secuencia de ADN de interés (ABC) procedentes de una biblioteca de los vectores precursores A, B y C.  $RS_1$  y  $RS_2$  son sitios de recombinación reconocidos por diferentes recombinasas/integrasas.

La Fig. 2 representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICBV19 y pICH10605.

GUS - gen de la beta-glucuronidasa; P35S - promotor de CaMV35S; BAR - gen de la fosfinotricin acetiltransferasa (pICH10605 tiene secuencias codificadoras de BAR que alteran el intrón); PNOS - promotor del gen de la sintasa de nopalina de *Agrobacterium*; TNOS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de nopalina de *Agrobacterium*; TOCS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de octopina.

La Fig. 3 representa esquemáticamente la región de ADN-T del vector binario pICH7410.

GFP - gen que codifica la proteína fluorescente verde; NPT - gen de la fosfotransferasa II de neomicina que confiere resistencia a kanamicina; POCS - región promotora del gen de la sintasa de octopina de *Agrobacterium*; NTR - región 3' no traducida del ARN del virus del mosaico del tabaco (VMT); AttB - sitio de recombinación.

La Fig. 4 representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los plásmidos pICH11140 y pICH11150. PACT2-i - promotor del gen de la actina 2 de *Arabidopsis* con el primer intrón.

La Fig. 5 representa las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICBV16 y pICH8430.

PACT2 - promotor del gen de la actina 2 de *Arabidopsis*; TVCV polimerasa - ARN polimerasa dependiente de ARN del virus del aclaramiento de las nervaduras del nabo (TVCV); MP - proteína del movimiento de tobamovirus; IRESmp75 - IRES de la proteína del movimiento de TMVcr.

La Fig. 6 representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICH11160 y pICH11170.

La Fig. 7 representa esquemáticamente la región de ADN-T resultante de la recombinación específica de sitio entre los ADN-Ts de pICH11150 y pICH11170. Esta región lleva un gen BAR interrumpido por un intrón que contiene un sitio de AttR. El ajuste del intrón después de la transcripción permite la transcripción permite la expresión de una proteína BAR funcional.

La Fig. 8 representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICH12022 y pICH12031 diseñados para la transformación de plantas monocotiledóneas. PUBQ - promotor del gen de la ubiquitina del maíz; PACT1 - promotor del gen de la actina 1 del arroz; IPT - gen que codifica la isopentenil transferasa.

La Fig. 9 representa esquemáticamente la región de ADN-T resultante de la recombinación específica de sitio entre regiones de ADN-T de los vectores binarios pICH12022 y pICH12031. La región lleva un gen BAR funcional con un intrón bajo el control del promotor PACT1 de la actina 1 del arroz.

La Fig. 10 representa un esquema de ensamblaje de una secuencia de ADN de interés (C) a partir de dos vectores precursores (A y B), incluyendo el ensamblaje de un gen marcador seleccionable funcional a partir de fragmentos de dicho gen marcador seleccionable denominados "Seleccionable" y "Marcador". Simultáneamente, un intrón (designado "INTRÓN") es ensamblado a partir de fragmentos intrónicos denominados "INT" y "RON".

P - promotor; T - región de terminación de la transcripción; CSM - marcador contraseleccionable; IRES -sitio interno de entrada al ribosoma.

Fig. 11 representa un esquema de ensamblaje de una secuencia de ADN de interés (C) a partir de dos vectores precursores (A y B), incluyendo el ensamblaje de un gen de interés funcional a partir de fragmentos de dicho gen de interés denominados "Gen de" e "Interés". Un marcador seleccionable bajo el control traduccional de un elemento IRES es convertido en expresable por dicho ensamblaje mediante la colocación del mismo bajo el control transcripcional de un promotor. Ambos vectores precursores A y B contienen un gen marcador contraseleccionable CSM. Mediante dicho ensamblaje, CSM lleva al producto de recombinación D que no contiene dicho gen de interés. Utilizando dicho CSM, pueden seleccionarse plantas o células vegetales transgénicas que no contienen el vector precursor A, ni el vector precursor B, ni el producto de recombinación D.

## ES 2 334 915 T3

P - promotor; T - región de terminación de la transcripción; CSM - marcador contraseleccionable; IRES - sitio interno de entrada al ribosoma.

5 La Fig. 12 representa esquemáticamente el ensamblaje de una secuencia de ADN de interés compleja C mediante recombinación específica de sitio *in planta* de los vectores A y B.

P - promotor; T - región de terminación de la transcripción; CSM - marcador contraseleccionable; IRES - sitio interno de entrada al ribosoma; Ds (3' o 5') - extremos de un elemento transponible no autónomo (Ds) reconocidos por la transposasa de Ac; dSpm (3' o 5') - extremos de un elemento transponible no autónomo (dSpm) reconocidos por la transposasa de Spm; GOI - gen de interés.

15 La Fig. 13 representa esquemáticamente un método para generar diferentes vectores alélicos a partir de una secuencia de ADN de interés ensamblada *in planta* de acuerdo con la Fig. 12.

P - promotor; T - región de terminación de la transcripción; CSM - marcador contraseleccionable; IRES - sitio interno de entrada al ribosoma; Ds (3' o 5') - extremos de un elemento transponible no autónomo (Ds) reconocidos por la transposasa de Ac; dSpm (3' o 5') - extremos de un elemento transponible no autónomo (dSpm) reconocidos por la transposasa de Spm; GOI - gen de interés.

20 La Fig. 14 - representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICH15820 y pICH15850 diseñados para la transformación de plantas di-cotiledóneas. Estos vectores pueden ser cotransformados en las plantas y se complementan unos a otros de acuerdo con la invención.

PACT2-I - promotor del gen de la actina 2 de *Arabidopsis* con intrón; IPT - gen que codifica la isopentenil transferasa; PIPT promotor de IPT; TIPT - región de terminación de la transcripción del gen IPT; NLS - señal de localización nuclear; TNOS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de nopalina de *Agrobacterium*; TOCS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de octopina.

30 La Fig. 15 representa esquemáticamente las regiones de ADN-T de los vectores binarios pICH17320 y pICH17330 diseñados para la transformación de plantas di-cotiledóneas. Estos vectores pueden ser cotransformados con, por ejemplo, pICH15850 para llevar a cabo el proceso de la invención.

PSpm - promotor de la transposasa de Spm de *Z. mays*; PHsp81.1 - promotor del gen HSP81.1 de *Arabidopsis*; IPT - gen que codifica la isopentenil transferasa; PIPT - promotor de IPT; TIPT - región de terminación de la transcripción del gen IPT; NLS - señal de localización nuclear; TNOS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de nopalina de *Agrobacterium*; TOCS - región de terminación de la transcripción del gen de la sintasa de octopina.

45 La Fig. 16 representa esquemáticamente los vectores pICH15830; pICBV2 y pICH15840.

La Fig. 17 representa esquemáticamente los vectores pICH13630, pICH15760 en (A) y pICH10881, pICH15770 en (B).

50 Fig. 18. Generación de transformantes del tabaco en medio no selectivo libre de hormonas. Morfología de los vástagos regenerados que contienen ADN-T con un gen IPT (A, B) y sin el gen IPT (C).

### Descripción detallada de la invención

55 En esta invención describimos un proceso para el ensamblaje *in planta* rápido, barato, de una secuencia de ADN de interés diseñada para su integración estable en un cromosoma de una planta. Este procedimiento permite *inter alia* una optimización rápida de las secuencias que van a ser expresadas mediante el análisis de la transcripción, traducción de las diferentes unidades ensambladas, de unidades con diferentes fusiones de proteínas o con una vectorización de proteínas diferente o con una modificación post-traducciona

60 lmente diferente, etc. Puede ser utilizada eficazmente para someter a selección bibliotecas de secuencias codificadoras o reguladoras de interés. Otra aplicación de la invención es el diseño de vectores más seguros que no puedan transferir la secuencia de interés a través de una transferencia génica ilícita. También, el clonaje difícil puede ser evitado durante el diseño de regiones de ADN complejas (por ejemplo que presenten inestabilidad durante los procedimientos de clonaje en células bacterianas) para una transformación nuclear estable, ya que dos o más fragmentos de ADN complejos pueden ser unidos *in planta* antes de su integración al ADN nuclear de la planta.

65 Los métodos actuales para la expresión de transgenes transitoria o constitutiva en plantas emplean normalmente la introducción en las células de la planta de vector(es) ensamblado(s) con el(los) gen(es) de interés. La expresión transitoria de una secuencia de interés está más allá del ámbito de esta invención. Las diferencias entre la expresión

transitoria y constitutiva de un transgén están muy bien ejemplificadas, por ejemplo, dentro del marco general de la genómica funcional de las plantas, donde la utilización de vectores víricos puede proporcionar de forma relativamente rápida alguna información inicial sobre una posible función de un transgén en algunos casos (WO993651; Kumagai y col., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1679-1683). En otros muchos casos, no se obtiene información ni artefactos. Además, la utilización de vectores víricos no permite el estudio posterior de la función de un transgén, por ejemplo durante el desarrollo de la planta, etc. Además, los vectores *Agrobacterium* o víricos como tales causan graves cambios en las células vegetales, haciendo así difícil el estudio de, por ejemplo, las funciones de los genes implicados en las interacciones planta-patógeno. Se requieren plantas transgénicas transformadas de manera estable con diferentes patrones de expresión (por ejemplo compartimentalización intercelular o intracelular, la expresión específica de un tejido, un órgano o una célula) para el estudio detallado de un gen de interés. De acuerdo con la presente invención, el ensamblaje, la optimización y la identificación de una secuencia de ADN de interés deseada para la transformación nuclear estable de células vegetales pueden llevarse a cabo con una alta eficacia *in planta*, y ser combinadas por tanto con la transformación de la planta como un procedimiento de una sola etapa. En todo lo que sigue, dichos al menos dos vectores diferentes de la invención son referidos también como vectores precursores.

El esquema general de tal ensamblaje a partir de dos o más vectores (precursores) mediante recombinación del ADN específica de sitio está mostrado en la Figura 1. El esquema más sencillo de tal ensamblaje es la creación de una secuencia de ADN de interés a partir de los dos vectores precursores A y B mediante recombinación utilizando el sitio de recombinación RS (Fig. 1A, I). No es necesario decir que tal acontecimiento de recombinación será seleccionable. Esto es fácil de conseguir si, por ejemplo, dicha recombinación crea un gen funcional que proporcione la selección.

En una realización preferida de la invención, una región de ADN-T (Fig. 7) que incluye dicha secuencia de ADN de interés es ensamblada a partir de dos vectores precursores representados por otras dos regiones de ADN-T (Figs. 4 y 6, parte inferior), mediante recombinación mediada por la integrasa de PhiC31. Dicha región de ADN-T puede contener un gen BAR funcional que está ausente en los vectores precursores, haciendo posible de este modo la selección por dicho acontecimiento de recombinación. La integrasa necesaria para el ensamblaje de la región de ADN-T de interés puede ser proporcionada de manera transitoria por uno de los vectores precursores, pICH11150 (Fig. 4). Debido a la irreversibilidad de las reacciones catalizadas por la integrasa de PhiC31, dicha integrasa puede ser también expresada de forma constitutiva por una planta o una célula vegetal manipulada genéticamente.

Muchas recombinasas/integrasas específicas de sitio diferentes que pueden ser utilizadas para la práctica de esta invención son conocidas en la técnica. Sistemas adecuados de recombinasas/sitios de recombinación incluyen, *inter alia*, el sistema Cre-Lox del bacteriófago P1 (Austin y col., 1981, *Cell*, 25, 729-736), el sistema FLP-FRT de *Saccharomyces cerevisiae* (Broach y col., 1982, *Cell*, 29, 227-234), el sistema R-RS de *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki y col., 1985, *J. Mol. Biol.*, 182, 191-203), la integrasa del fago PhiC31 de *Streptomyces* (Thorpe y Smith, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 5505-5510; Groth y col., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5995-6000) y resolvasas. En esta invención se prefiere la utilización de recombinasas específicas de sitio con un modo de acción irreversible, ya que esto permite crear un producto de recombinación estable conteniendo dicha secuencia de ADN de interés con una estructura predecible.

La elección de un promotor adecuado para conducir la expresión de la recombinasa es particularmente valiosa, ya que afecta directamente al funcionamiento del proceso de la invención, por ejemplo a la eficacia del ensamblaje de las regiones de ADN-T y de la recuperación de los transformantes primarios deseados en la especie vegetal de elección. La combinación del vector pICH15850, portador de un extremo 5' del gen BAR (Fig. 14), con diferentes vectores complementarios (por ejemplo pICH15820, pICH17320 o 17330) produce resultados diferentes en especies vegetales diferentes. Por ejemplo, el promotor de la actina 2 de *Arabidopsis* funciona mejor en *Arabidopsis* que en el tabaco, aunque el promotor del gen HSP81.1 de *Arabidopsis* produce resultados similarmente buenos en ambas plantas, *Arabidopsis* y tabaco.

Pueden utilizarse diferentes métodos para proporcionar a una célula vegetal o a una planta dichos al menos dos vectores diferentes (vectores precursores). Dichos vectores pueden ser transformados en las células vegetales mediante un vector plasmídico Ti portado por *Agrobacterium* (US 5.591.616; US 4.940.838; US 5.464.763) o mediante bombardeo de partículas o microproyectiles (US 05100762; EP 00444882B1; EP 00434616B1). Pueden utilizarse también otros métodos de transformación de plantas tales como microinyección (WO 09209696; WO 09400583A1, EP 175966B1), electroporación (EP00564595B1; EP00290395B1; WO08706614A1) o transformación de protoplastos mediada por PEG, etc. La elección de la administración de los vectores precursores, así como de los protocolos de transformación, depende de la especie vegetal que vaya a ser transformada. Por ejemplo, se prefiere generalmente el bombardeo con microproyectiles para la transformación de monocotiledóneas, mientras que para dicotiledóneas la transformación mediada por *Agrobacterium* produce en general mejores resultados.

En la realización anteriormente descrita, utilizamos la administración de los vectores precursores a células de *Nicotiana* mediada por *Agrobacterium*. Sin embargo, el ADN heterólogo puede ser introducido en las plantas de acuerdo con cualquiera de las técnicas estándar adecuadas para la transformación estable de la especie vegetal de interés. Las técnicas de transformación de dicotiledóneas son bien conocidas en el oficio e incluyen técnicas basadas en *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas que no requieren *Agrobacterium* implican la captación del material genético exógeno directamente por los protoplastos o las células. Estas técnicas incluyen la captación mediada por PEG o por electroporación, la administración mediada por bombardeo de partículas y la

microinyección. Ejemplos de estas técnicas están descritos en Paszkowski y col., *EMBO J.*, 3, 2717-2722 (1984), Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199, 169-177 (1985), Reich y col., *Biotechnology*, 4, 1001-1004 (1986) y Klein y col., *Nature*, 327, 70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas son regeneradas para dar lugar a las plantas completas utilizando técnicas estándar.

5

La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas debido a su elevada eficacia de transformación y a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. Las muchas especies de cultivo que pueden ser transformadas rutinariamente por *Agrobacterium* incluyen tabaco, tomate, girasol, algodón, colza, patata, soja, alfalfa y chopo (EP 0 317 511 (algodón), EP 0 249 432 (tomate), WO 87/07299 (*Brassica*),  
10 Patente de EE.UU. 4.795.855 (chopo)). La transformación con *Agrobacterium* implica típicamente la transferencia del vector binario portador del ADN foráneo de interés a una cepa apropiada de *Agrobacterium* que puede depender del complemento de los genes *vir* portados por la cepa de *Agrobacterium* huésped, ya sea en un plásmido corresidente o cromosómicamente (Uknes y col., *Plant Cell*, 5, 159-169 (1993)). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* puede ser llevada a cabo mediante un procedimiento de apareamiento triparental utilizando *E. coli*  
15 portadora del vector binario recombinante, una cepa de *E. coli* cooperadora que lleva un plásmido tal como pRK2013, que es capaz de movilizar el vector binario recombinante hacia la cepa de *Agrobacterium* diana. Alternativamente, el vector binario recombinante puede ser transferido a *Agrobacterium* mediante transformación del ADN (Höfgen y Willmitzer, *Nucl. Acids Res.*, 16, 9877 (1988)).

20 La transformación de la especie vegetal diana por *Agrobacterium* recombinante implica normalmente el co-cultivo del *Agrobacterium* con explantes de la planta siguiendo protocolos conocidos en la técnica. El tejido transformado portador de un marcador de resistencia a un antibiótico o a un herbicida presente entre los límites del ADN-T del plásmido binario puede ser regenerado en un medio seleccionable.

25 Las técnicas de transformación preferidas para monocotiledóneas incluyen la transferencia directa de genes a los protoplastos utilizando PEG o técnicas de electroporación y bombardeo de partículas en el tejido del callo.

Las solicitudes de patente EP 0 292 435, EP 0 392 225 y WO 93/07278 describen técnicas para la preparación de callos y protoplastos de maíz, para la transformación de protoplastos utilizando PEG o electroporación y para la  
30 regeneración de las plantas de maíz a partir de los protoplastos transformados. Gordon-Kamm y col., *Plant Cell*, 2, 603-618 (1990) y Fromm y col., *Biotechnology*, 11, 194-200 (1993), describen técnicas para la transformación de líneas endogámicas de maíz de élite mediante bombardeo de partículas.

La transformación del arroz puede ser también llevada a cabo mediante técnicas de transferencia directa de genes  
35 utilizando protoplastos o bombardeo de partículas. La transformación mediada por protoplastos ha sido descrita para tipos de *Japonica* y para tipos de *Indica* (Zhange y col., *Plant Cell Rep.*, 7, 739-384 (1988); Shimamoto y col., *Nature*, 338, 274-277 (1989); Datta y col., *Biotechnology*, 8, 736-740 (1990)). Ambos tipos son también transformables de manera rutinaria utilizando bombardeo de partículas (Christou y col., *Biotechnology*, 9, 957-962 (1991)). Es aplicable también la transformación del arroz mediada por *Agrobacterium* (Chan y col., 1993, *Plan Mol. Biol.*, 22, 491-506).

40

EP 0 332 581 describe técnicas para la generación, transformación y regeneración de protoplastos de *Pooideae*. Además, la transformación del trigo ha sido descrita por Vasil y col., *Biotechnology*, 10, 667-674 (1992) utilizando bombardeo de partículas en células de callos regenerables de larga duración de tipo C. Vasil y col., *Biotechnology*, 11,  
45 1553-1558 (1993) y Weeks y col., *Plant Physiol.*, 102, 1077-1084 (1993) describen el bombardeo con partículas de embriones inmaduros y de callos derivados de embriones inmaduros.

La transformación de células de monocotiledóneas tales como *Zea mays* puede ser llevada a cabo poniendo en contacto las células de la monocotiledónea con una multiplicidad de cuerpos similares a agujas sobre los cuales estas células pueden ser insertadas, produciendo la ruptura de la pared celular y permitiendo de este modo la entrada del  
50 ADN transformante en las células (ver la Patente de EE.UU. 5.302.523). Técnicas de transformación aplicables a monocotiledóneas y dicotiledóneas están descritas también en las Patentes de EE.UU. siguientes: 5.240.855 (pistola de partículas); 5.204.253 (microproyectiles acelerados por un golpe de gas frío); 5.179.022 (aparato de biolística); 4.743.548 y 5.114.854 (microinyección); y 5.149.655 y 5.120.657 (transformación mediada por partículas aceleradas); 5.066.587 (acelerador de microproyectiles accionado por gas); 5.015.580 (transformación de plantas de soja mediada por partículas); 5.013.660 (transformación mediada por un rayo láser); 4.849.355 y 4.663.292.

55

Las células vegetales transgénicas o el tejido vegetal transgénico transformados mediante uno de los métodos anteriormente descritos pueden ser cultivados posteriormente hasta conseguir plantas completas de acuerdo con técnicas estándar. Pueden obtenerse semillas transgénicas a partir de plantas transgénicas en flor de acuerdo con técnicas estándar. De igual modo, plantas no florecientes tales como la patata y la remolacha azucarera pueden ser propagadas mediante una variedad de procedimientos conocidos. Ver, por ejemplo, Newell y col., *Plant Cell Rep.*, 10, 30-34  
60 (1991) (que describe la transformación de la patata mediante el cultivo de tallos).

El ensamblaje de una secuencia de ADN de interés *in planta* a partir de los vectores precursores puede ser facilitado enormemente por la presencia de secuencias cooperadoras (auxiliares) A' y B' (Fig. 1A, II) que están preferiblemente ausentes en la secuencia de ADN ensamblada de interés AB (Fig. 1A, II). Estas secuencias cooperadoras pueden dar lugar a productos de recombinación que no contengan dicha secuencia de ADN de interés. Tales secuencias auxiliares pueden proporcionar genes de interés que son necesarios para el ensamblaje de la secuencia de ADN de interés

65

(por ejemplo recombinasas), para la eliminación de los transformantes portadores de un vector precursor integrado de manera estable en el ADN cromosómico (por ejemplo, utilizando genes marcadores contraseleccionables), para proporcionar de manera transitoria productos génicos necesarios para las etapas tempranas del cultivo de tejidos (por ejemplo, genes responsables de la biosíntesis de fitohormonas), etc.

En una realización preferida de la invención, se describe la generación de una secuencia de ADN de interés para plantas monocotiledóneas (Fig. 9) a partir de vectores precursores (Fig. 8). Dichos vectores precursores pueden contener dos tipos de secuencias auxiliares - una puede proporcionar la integrasa de PhiC31 específica de sitio y la otra puede proporcionar la isopentenil transferasa (IPT) que altera las citoquininas endógenas en las células vegetales afectadas (Medford y col., 1989, *Plant Cell*, 1 403-413). El gen IPT, además de ser utilizado como inductor de la formación de las yemas axilares, puede ser utilizado como gen marcador seleccionable que produce una anomalía morfológica en la planta una vez que se ha integrado de manera estable en el ADN cromosómico (Ebinuma y col., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2117-2121). En esta realización, el gen IPT puede ser utilizado como marcador contraseleccionable que permite la identificación y la eliminación de los tejidos vegetales transformados que contienen secuencias de los vectores precursores integradas de manera estable en el ADN genómico. La Fig. 18 muestra regenerantes de tabaco que contienen el gen IPT en el ADN-T. Son claramente distintos de los regenerantes que no tienen el gen IPT. Otros ejemplos de marcadores contraseleccionables (CSM) para ser utilizados en la presente invención son el gen que codifica la citosina desaminasa condicionalmente letal (cod A) (Gleave y col., 1999, *Plant Mol. Biol.*, 40, 223-235) o un gen que codifica el citocromo P-450 bacteriano (O'Keefe y col., 1994, *Plant Physiol.*, 105, 473-482).

En otra realización preferida, se utiliza una mezcla de más de dos vectores precursores diferentes para ensamblar varias secuencias de ADN de interés. Dichas secuencias de ADN de interés pueden ser el resultado de acontecimientos de recombinación específica de sitio aleatorios entre dos conjuntos de vectores precursores (conjunto A<sub>n</sub> y conjunto B<sub>n</sub>, Fig. 1B, I). Realmente, puede generarse un conjunto de secuencias de ADN de interés del tipo A<sub>n</sub>B<sub>n</sub> en una célula vegetal mediante la recombinación específica de sitio de un conjunto de vectores precursores (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, ..., A<sub>n</sub>) con un conjunto de vectores precursores (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n</sub>), donde n es el número de vectores precursores de tipo A o de tipo B. Al menos tres vectores precursores diferentes son necesarios para dotar a la célula de al menos dos secuencias de ADN de interés diferentes. El número de todas las combinaciones posibles de secuencias de ADN de interés que pueden ser ensambladas a partir de la pluralidad de vectores precursores A y de la pluralidad de vectores precursores B, puede ser calculado multiplicando el número de vectores precursores de tipo A por el número de vectores precursores de tipo B.

Ejemplos de secuencias de ácido nucleico representadas como parte de A o B y unidas entre sí mediante recombinación específica de sitio pueden ser secuencias codificadoras o partes de las mismas o cualquier elemento genético. En la presente, tal elemento genético (o elemento regulador) puede ser cualquier elemento ADN que tenga una función genética definida a nivel de ADN o ARN, siendo dicha función distinta de la codificación de una parte estructural de un gen. Ejemplos incluyen: intensificadores de la transcripción, promotores o partes de los mismos, intensificadores de la traducción, sitios de recombinación, secuencias de terminación de la transcripción, sitios internos de entrada al ribosoma (IRESes), sitios de restricción, secuencias de replicación autónoma u orígenes de replicación.

En esta invención, el producto de recombinación que contiene dicha secuencia de ADN de interés puede constar de componentes de más de dos vectores precursores. En la Fig. 1B, II, se muestra el ensamblaje de tal secuencia de ADN de interés que contiene porciones de las secuencias de tres vectores precursores diferentes, A, B y C. Sin embargo, para el ensamblaje eficaz de dicha secuencia de ADN de interés, puede requerirse la utilización de más de un tipo de recombinasa y/o integrasas.

El ensamblaje de una secuencia de ADN de interés para su integración estable en un cromosoma de una planta permite la selección de células vegetales con dicha secuencia de ADN de interés integrada en el ADN cromosómico. Un posible mecanismo de selección por dicha secuencia de ADN de interés es el ensamblaje de un gen marcador seleccionable funcional según está descrito con detalle en los Ejemplos 1-3 y mostrado de manera general en la Figura 10. La utilización de un gen marcador contraseleccionable (CSM) en todos los vectores precursores (Figuras 10 y 11) permite la eliminación fácil de las células vegetales portadoras de vectores precursores integrados de manera estable en el ADN cromosómico. En algunos casos, el ensamblaje de una secuencia de ADN de interés junto con el ensamblaje de un gen de interés funcional podría ser una ventaja, por ejemplo cuando el gen de interés es tóxico para células bacterianas. El marcador seleccionable en tales casos puede ser parte de una construcción bicistónica bajo el control de un elemento IRES (Figura 11). La recombinación específica de sitio de los vectores precursores (A y B en la Fig. 11) puede dar lugar a la formación de una secuencia de ADN de interés portadora de la construcción bicistónica funcional con el gen de interés seguido por un gen marcador seleccionable controlado por el IRES. La utilización de elementos IRES en plantas es conocida en la técnica anterior (WO9854342; WO0246440; Dorokhov y col., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 5301-5306) y puede ser practicada de manera rutinaria en combinación con la presente invención.

El ensamblaje de vectores complejos *in planta* a partir de vectores precursores que tienen una estructura más simple puede ser una ventaja adicional, ya que permite evitar de clonaje y/o manipulación complejas con estructuras de ADN inestables en células bacterianas. El ensamblaje de la secuencia de ADN de interés para generar diferentes vectores derivados en posición alélica unos respecto de otros está mostrado en la Fig. 12. Dicha secuencia de ADN de interés (Fig. 12, C) integrada de manera estable en el ADN cromosómico de la planta puede ser expuesta además a una transposasa de elección (Ac o Spm, Fig. 13), permitiendo eliminar las secuencias vectorizadas (flanqueadas por secuencias Ds para Ac o por secuencias dSpm para Spm). Los vectores derivados finales B y C (Fig. 13) están en

relación alélica entre sí y codifican diferentes partes de un gen de interés (GOI) que pueden ser ensambladas mediante ajuste en trans mediado por inteína. Este procedimiento está dirigido a cuestiones de bioseguridad, por ejemplo al control de la segregación del transgén, ya que los dos fragmentos del mismo gen que proporcionan un rasgo de interés se segregarán siempre a gametos diferentes debido a su localización alélica. Detalles sobre plantas transgénicas biológicamente/medioambientalmente seguras que tienen fragmentos de un transgén en relación alélica pueden ser encontrados en WO03/102197.

Las plantas o células vegetales transgénicas producidas de acuerdo con la invención pueden ser utilizadas para muchos fines diferentes, algunos de los cuales han sido mencionados anteriormente. En una aplicación adicional, la secuencia de ADN de interés ensamblada *in planta* puede ser utilizada a su vez como vector precursor para procesos corriente abajo. Dicha secuencia de ADN de interés puede ser inducida, por ejemplo, para que forme un ADN extracromosómico como un vector episómico mantenido independientemente. Esta inducción puede ser conseguida, por ejemplo, cruzando una planta transgénica de la invención portadora de dicha secuencia de ADN de interés con otra planta que proporcione un factor capaz de ejercer la función inductora o de estimular la formación de dicho ADN extracromosómico/episómico. Alternativamente, la formación de tal ADN episómico puede ser causada por, por ejemplo, la expresión transitoria de un factor (por ejemplo una transposasa, una replicasa vírica, etc.) capaz de estimular la formación del ADN extracromosómico/episómico a partir de dicha secuencia de ADN de interés. Dicho ADN episómico puede ser capaz de una reintegración posterior (por ejemplo puede ser o tener las propiedades de un elemento transponible) o ser capaz de un mantenimiento independiente durante las divisiones celulares (derivado de un vector vírico de ADN).

La presente invención se lleva a cabo preferiblemente con plantas superiores multicelulares. Las plantas preferidas para ser utilizadas en esta invención incluyen cualquier especie de la planta, dándose preferencia a las especies agrónomicamente y hortícolamente importantes. Las plantas de cultivo comunes para ser utilizadas en la presente invención incluyen alfalfa, cebada, frijoles, cánola, arveja de vaca, algodón, maíz, trébol, loto, lentejas, lupino, mijo, avena, guisante, cacahuete, arroz, centeno, trébol dulce, girasol, guisante de olor, soja, sorgo triticale, judías de ñame, judías terciopelo, arveja, trigo, glicina y plantas de nuez. Las especies de plantas preferidas para la práctica de esta invención incluyen, pero no se limitan a: especies representativas de *Gramineae*, *Compositae*, *Solanaceae* y *Rosaceae*. Adicionalmente, las especies preferidas para ser utilizadas en la invención, además de las especificadas anteriormente, son plantas de los géneros: *Arabidopsis*, *Agrostis*, *Allium*, *Antirrhinum*, *Apium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Bambusa*, *Brassica*, *Bromus*, *Browaalia*, *Camellia*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Cicer*, *Chenopodium*, *Chichorium*, *Citrus*, *Coffea*, *Coix*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Datura*, *Daucus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Eleusine*, *Festuca*, *Fragaria*, *Geranium*, *Glycine*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hevea*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lens*, *Lilium*, *Linum*, *Lolium*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Majorana*, *Malus*, *Mangifera*, *Manihot*, *Medicago*, *Nemesia*, *Nicotiana*, *Onobrychis*, *Oryza*, *Panicum*, *Pelargonium*, *Pennisetum*, *Petunia*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Phleum*, *Poa*, *Prunus*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Ribes*, *Ricinus*, *Rubus*, *Saccharum*, *Salpiglossis*, *Secale*, *Senecio*, *Setaria*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Stenotaphrum*, *Theobroma*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vigna*, *Vitis*, *Zea* y las *Olyreae*, las *Pharoideae* y muchas otras.

Dentro del ámbito de esta invención, las especies de plantas que no están incluidas en la cadena de alimentos o piensos son preferidas específicamente para la producción de proteínas farmacéuticas y técnicas. Entre ellas, las especies de *Nicotiana* son las más preferidas, ya que son especies fáciles de transformar y cultivar con sistemas de vectores de expresión bien desarrollados (especialmente vectores víricos).

Los genes de interés, sus fragmentos (funcionales o no funcionales) y sus derivados artificiales que pueden ser expresados en plantas o en células vegetales utilizando la presente invención incluyen, pero no se limitan a: enzimas modificadores del almidón (sintasa de almidón, enzima de fosforilación del almidón, enzima desramificador, enzima ramificador del almidón, enzima ramificador del almidón II, sintasa de almidón unida a los gránulos), fosfato sintasa de sacarosa, fosforilasa de sacarosa, poligalactouronasa, polifrután sucrasa, ADP glucosa fosforilasa, glucosiltransferasa de ciclodextrina, transferasa de fructosilo, sintasa de glucógeno, esterasa de pectina, aprotinina, avidina, levansucrasa bacteriana, proteína glgA de *E. coli*, MAPK4 y ortólogos, enzima para la asimilación/metabolismo del nitrógeno, sintasa de glutamina, osmotina vegetal, albúmina 2S, taumatina, recombinasa específica de sitio/integrasa (FLP, Cre, recombinasa R, Int, Integrasa R de SSVI, Integrasa de PhiC31, o un fragmento activo o variante de las mismas), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de soja), toxina de tipo coleóptero o un fragmento insecticida activo, proteínas de fusión del enzima de conjugación de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, superóxido dismutasa, forma preenzimática inactiva de una proteasa, toxinas proteicas vegetales, rasgos que alteran la fibra en las plantas productoras de fibra, toxina activa frente a coleópteros procedente de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt2, proteína cristalina insecticida (ICP), toxina CryIC, endotoxina delta, toxina polipeptídica, protoxina, etc.), toxina específica de insectos AaIT, enzimas que degradan celulosa, celulasa E1 de *Acidothermus cellulosus*, enzimas modificadores de la lignina, cinnamoil alcohol deshidrogenasa, sintasa de trehalosa-6-fosfato, enzimas de la ruta metabólica de las citoquinas, HMG-CoA reductasa, pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, proteína de almacenamiento de las semillas, sintasa de licopeno de *Erwinia herbicola*, oxidasa de ACC, proteína codificada por pTOM36, fitasa, cetohidrolasa, acetoacetyl CoA reductasa, sintasa de PHB (polihidroxibutanoato), proteína transportadora de acilo, napina, EA9, sintasa de fitoeno de plantas no superiores, proteína codificada por pTOM5, ETR (receptor de etileno), piruvato fosfato diquinasas plastídicas, proteína del poro transmembranal inducible por nematodos, rasgo intensificador de la función fotosintética o plastídica de la célula vegetal, sintasa de estilbeno, un enzima capaz de hidroxilar fenoles, catecol dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, cicloisomerasa de cloromuconato, sintasa de antranilato, proteína AGL15 de *Brassica*, fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), RNA3 de AMV, replicasa

de PVY, replicasa de PLRV, proteína de revestimiento de potivirus, proteína de revestimiento de CMV, proteína de revestimiento de TMV, replicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa geminivírica mutante, C12:0 de *Umbellularia californica* prefiriendo acil-ACP tioesterasa, C10 o C12:0 vegetal prefiriendo acil-ACP tioesterasa, C14:0 prefiriendo acil-ACP tioesterasa (luxD), factor A de la sintasa vegetal, factor B de la sintasa vegetal, D6-desaturasa, proteína con actividad enzimática en b-oxidación peroxisómica de los ácidos grasos en células vegetales, acil-CoA oxidasa, 3-cetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA carboxilasa del maíz, sintasa de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP), acetil transferasa de fosfotricina (BAR, PAT), proteína CP4, desaminasa de ACC, proteína con un sitio de corte post-traducciona, gen DHPS que confiere resistencia a sulfonamidas, nitrilasa bacteriana, 2,4-D-monooxigenasa, sintasa de acetolactato o sintasa de acetohidroxiácido (ALS, AHAS), poligalactouronasa, polimerasa Taq, nitrilasa bacteriana, muchos otros enzimas de bacterias o fagos incluyendo endonucleasas de restricción, metilasas, ADN y ARN ligasas, ADN y ARN polimerasas, transcriptasas inversas, nucleasas (ADNasas y ARNasas), fosfatasa, transferasas, etc.

La presente invención puede ser utilizada también para la producción molecular y la purificación de proteínas comercialmente valiosas y farmacéuticamente importantes, incluyendo enzimas industriales (celulasas, lipasas, proteasas, fitasas, etc.) y proteínas fibrosas (colágeno, proteína de la seda de araña, etc.). Pueden expresarse y purificarse proteínas para la salud humana o animal utilizando las descripciones de los procedimientos de nuestra invención. Ejemplos de tales proteínas de interés incluyen, *inter alia*, proteínas de la respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, receptores de células T, etc.), antígenos, incluyendo los derivados de microorganismos patógenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas incluyendo somatotropina (HGH) y proinsulina, citoquinas y sus receptores, interferones, factores de crecimiento y factores de coagulación, enzima lisosómico enzimáticamente activo, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación de la sangre, tripsinógeno, a1-antitripsina (AAT), seroalbúmina humana, glucocerebrosidasas, toxina B del cólera nativa, así como proteínas conservadoras de la función como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas anteriores.

Las proteínas anteriores y otras pueden ser optimizadas para una finalidad deseada mediante la introducción de mutaciones aleatorias en sus secuencias codificadoras o mediante métodos de transposición génica. La selección de una proteína que tenga propiedades optimizadas para el fin deseado puede ser posteriormente realizada utilizando el proceso de la presente invención.

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar la presente invención.

### Ejemplo 1

*Diseño de vectores para la transformación estable de plantas dicotiledóneas con un gen BAR dividido*

#### *Diseño de pICH11150*

Esta construcción fue producida sobre la base del vector binario pICBV-19 (Figura 2). Como primera etapa de clonaje, se introdujeron en el gen BAR los sitios de restricción de BsaI dianas para la inserción en el intrón (construcción pICH10605, Figura 2). El enzima BsaI corta el ADN fuera del sitio de reconocimiento, haciendo que sobresalgan 4 nucleótidos. En el caso de pICH10605, el enzima BsaI fue utilizado para introducir sitios aceptores y donantes de ajuste para la posterior inserción en el intrón. Como etapa siguiente, un fragmento de PCR amplificado en la construcción pICH7410 (Figura 3) con los oligos int-ad-9 (5'-tttttggtc cgacctgcaa caataagaac aaaaagtcatt aaatt-3') y attbpr11 (5'-tttaagcttg agctctttcc taggctcgaa gccgcggtgc gggtg-3') fue insertado en pICH10605 utilizando los sitios de restricción de BsaI y HindIII. El fragmento de PCR que contenía AttB y la parte 3' del intrón así como sitios de restricción de AvrII y SacI, sustituyó al casete de expresión de GUS y a la parte 5' del casete de expresión de BAR. La parte de ADN-T de la construcción resultante (pICH11140, Figura 4) contenía la parte 3' del casete de expresión de BAR: AttB, parte 3' del intrón, parte 3' del gen BAR y el terminador de OCS, así como sitios de restricción de AvrII y SacI. Como etapa final del clonaje de la construcción 3', se introdujeron en pICH11140 un casete de expresión de la integrasa de PhiC31 que contenía el promotor de la actina 2 de *Arabidopsis*, la integrasa de PhiC31 y el terminador de NOS, utilizando los sitios de restricción de AvrII y SacI. La construcción final pICH11150, que contenía el extremo 3' del gen BAR con AttB, un sitio de recombinación junto con el extremo 3' del intrón así como el casete de expresión de la integrasa de PhiC31, está mostrada en la Figura 4.

#### *Diseño de pICH11170*

Esta construcción fue producida sobre la base del vector binario pICBV-16 (Figura 5). El fragmento de PCR amplificado de pICH8430 (Figura 5) con los oligos int-ad-10 (5'-tttaagcttg aattcttttg gtctcaggta agtttcattt tcataattac aca-3') y attppr14 (5'-ttttcaatt ggagctccta cgcccccaac tgagagaac-3') fue cortado con los enzimas de restricción HindIII y MfeI e introducido en pICBV-16 digerido con HindIII y EcoRI. El fragmento de PCR que contenía la parte 5' del intrón y AttP así como sitios de restricción de BsaI y EcoRI, sustituía al casete de expresión de GUS en la construcción intermedia pICH11160 (Figura 6). Como etapa final del clonaje, un fragmento de EcoRI/BsaI de pICH10605 (Fig. 2) conteniendo un promotor de NOS y la parte 5' del gen BAR fue insertado en pICH11160. La región de ADN-T de la construcción final pICH11170 está mostrada en la Figura 6.

A continuación se describen vectores adicionales para ser utilizados en la invención.

#### Diseño de pICH17330

El fragmento de ADN AvrII/NcoI que contenía el promotor de Hsp81.1 de *Arabidopsis* y un fragmento del ORF de la integrasa de PhiC31, fue transferido a la construcción pICH15820 (Fig. 14) linealizada con los enzimas AvrII y NcoI, dando lugar a pICH17330 (Fig. 15).

#### Diseño de pICH17320

El fragmento de ADN SpeI/NcoI que contenía el promotor completo de Spm y el fragmento del ORF de la integrasa de PhiC31 fue transferido a la construcción pICH15820 (Fig. 14) linealizada con los enzimas AvrII y NcoI, dando lugar a pICH17320 (Fig. 15).

#### Diseño de pICH15850

El fragmento NotI/SacI de pICH11170 (Fig. 6) fue fusionado con los adaptadores adipt1 (5' ggccgctttt tatgcattt ttgagctct cgcgaggatc ctactg 3') y adipt2 (5' aggatcctcg cgagagctca aaaaatgcat aaaaagc 3') que destruían el sitio original de SacI e introducían sitios de BamHI, SacI y NsiI, produciendo pICH15830 (Fig. 16). Para el clonaje de pICH15840, el fragmento NotI/NsiI de pICBV2 (Fig. 16) fue transferido a la construcción pICH15830 (Fig. 16), reintroduciendo la región limítrofe izquierda del ADN-T que había sido escindida en la primera etapa de clonaje. El fragmento BamHI/SacI de pICH15820 (Fig. 14) que contenía el gen IPT completo fue transferido a pICH15840, teniendo como resultado pICH15850 (Fig. 14).

#### Diseño de pICH15820

El clonaje de la construcción de BAR dividido en 3' con el gen de la isopentenil transferasa (IPT) (pICH15820) constó de varias etapas. En la construcción pICH13630 (Fig. 17, A), el adaptador adipt3/adipt4 que destruía los sitios originales de AvrII y SacI e introducía sitios de SacI y AvrII en orientación inversa, sustituía al fragmento AvrII/SacI. Además, este adaptador introducía sitios de SpeI y XhoI para la inserción del gen IPT (pICH15760, Fig. 17, A). El fragmento AvrII/SacI que contenía un casete de expresión de la integrasa de PhiC31 (promotor de la actina 2 de *Arabidopsis*-ORF de la integrasa de PhiC31 con señal de localización nuclear C-terminal-terminador de nos) fue transferido desde pICH10881 a pICH15760, teniendo como resultado pICH15770 (Fig. 17, B).

El gen de la isopentenil isotransferasa (IPT) (incluyendo regiones promotoras y terminadoras originales) de la cepa C58 de *Agrobacterium* (2 kb aproximadamente) fue amplificado mediante PCR como 4 fragmentos flanqueados por sitios de restricción de BsaI. Los fragmentos de PCR fue subclonados en vectores pGEM-T y aislados posteriormente utilizando el enzima BsaI que tiene su sitio de reconocimiento fuera del sitio de digestión. Esto permite crear salientes de 4 pb con cualquier secuencia de nucleótidos capacitada para ensamblar el gen IPT completo e insertar el mismo en la construcción pICH15770 (Fig. 17) linealizada con XhoI/SpeI en una etapa de ligadura. Este clonaje tuvo como resultado pICH15820 (Fig. 14).

#### Ejemplo 2

##### Transformación mediada por *Agrobacterium* de la planta dicotiledónea *Nicotiana tabacum* (cv Petit Havana) y de *Arabidopsis thaliana* con la región de ADN-T ensamblada *in planta*

Las construcciones pICH11150 y pICH11170 fueron inmovilizadas en *A. tumefaciens* (GV3101) y utilizadas para la transformación mediada por *Agrobacterium* de discos de hoja de plantas de *Nicotiana* (Horsh y col., 1985, *Science*, 227, 1229-1231) utilizando como marcador seleccionable 10 mg/l de fosfinotricina (PPT). Plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron transformadas utilizando un protocolo de infiltración en vacío (Bechtold y col., 1993, C.R. Acad. Sci. Paris Life Sci., 316, 1194-1199). Los transformantes resistentes a fosfinotricina (PPT<sup>R</sup>) fueron seleccionados pulverizando plántulas de una semana de edad con 2,5 ml/l de solución Harvest<sup>TM</sup> (Agrevo) (ingrediente activo glufosinato, compuesto análogo a PPT disponible comercialmente).

Plantas de tabaco regeneradas y transformantes primarios de *A. thaliana* seleccionados fueron analizados mediante PCR para determinar la presencia de una región de ADN-T ensamblada *in planta* integrada de manera estable en el ADN cromosómico (Fig. 7) y para determinar la ausencia de regiones de ADN-T de pICH11150 y pICH11170. El análisis mediante PCR demostró que el 8% aproximadamente de todos los transformantes de *Arabidopsis* contenían la región de ADN-T deseada (Fig. 7) sin regiones de ADN-T cointegradas de pICH11150 y pICH11170. El mismo análisis de las plantas regeneradas de tabaco reveló una frecuencia de plantas con el genotipo deseado significativamente menor que la observada con *Arabidopsis* - menos del 0,1%. Resultados similares a los descritos anteriormente fueron obtenidos con el par de construcciones complementarias pICH15820 y pICH15850 (Fig. 14). Sin embargo, no había transformantes primarios resultantes de la cointegración (y restauración de la actividad BAR por la formación del intrón) de dichas regiones de ADN-T, sino solamente procedentes de la recombinación específica de sitio. Esto podría ser explicado por la presencia de una región grande que separaba las partes 3' y 5' de los intrones de los ADN-Ts cointegrados. Se generó un nuevo grupo de construcciones utilizando integrasa bajo el control de diferentes promo-

tores (el de la transposasa de Spm de *Zea mays* (pICH17320, Fig. 15), o el de la proteína del golpe de calor Hsp81.1 de *Arabidopsis* (pICH17330, Fig. 15)). Estos vectores en combinación con el vector complementario pICH15850 (Fig. 14) mostraron resultados mucho mejores que el vector pICH15820 (Fig. 14). Por ejemplo, la frecuencia de transformantes de tabaco que llevaban las regiones de ADN-T recombinadas correctamente sin ADN-Ts cointegrados era del 10% aproximadamente o más dependiendo de los experimentos. Esto demuestra que la eficacia del proceso puede ser influenciada mediante el control de la eficacia de la expresión de la integrasa y que puede ser ajustada a cualquier especie vegetal de interés. Los fenotipos de las plantas de tabaco regeneradas con y sin el gen IPT están mostrados en la Figura 18.

### Ejemplo 3

#### *Diseño de vectores y transformación mediada por Agrobacterium de plantas monocotiledóneas con el gen BAR dividido*

En el diseño de construcciones utilizando un gen BAR dividido para monitorizar el ensamblaje *in planta* de la región de ADN-T deseada, se utilizaron las construcciones originales pICH11150 y pICH11170 (ver el Ejemplo 1). La construcción pICH11150 fue modificada sustituyendo el promotor de la actina 2 de *Arabidopsis* (PACT2-i) por el promotor de la actina 1 del arroz (PACT1) (McEl-roy, D. y col., 1991, *Mol. Gen. Genet.*, 231, 150-160) dando lugar a la construcción pICH12022 (Figura 8). La construcción pICH11170 fue modificada sustituyendo el promotor de la sintasa de nopalina (PNOS), que dirige la expresión del fragmento del gen BAR, por el promotor de la actina 1 del arroz (PACT1) y el casete de expresión de NPTII por el casete de expresión de IPT (isopentenil transferasa, N° de Acceso del Gene Bank: X14410) bajo el control del promotor del gen de la ubiquitina del maíz (PUBQ) (Christensen, A.H. y Quail, P.H., 1996, *Transgenic Res.*, 5, 213-218) dando lugar a la construcción pICH12031 (Figura 8). Todas las manipulaciones para el diseño de las construcciones fueron llevadas a cabo utilizando procedimientos estándar de clonaje (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press).

Se utilizó la línea PEN3 de *Pennisetum glaucum* para la transformación mediada por *Agrobacterium* con los plásmidos pICH12022 y pICH12031. Alícuotas de *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1 portadoras de pICH12022 o pICH12031 fueron mezcladas en proporciones iguales y utilizadas para la transformación según se describe a continuación.

El medio de cultivo incluía sales de Murashige y Skoog (MS) y vitaminas: (Referencia: Murashige, T. y Skoog, F.A., 1962, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497) con 2,0 mg/l de 2,4-D, que es ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 30 g/l de sacarosa y un 0,3% de gelrite. El medio de regeneración contenía sales MS de potencia mitad y vitaminas con 20 g/l de maltosa, 1 mg/l de IAA, 1 mg/l de Zeatina y un 0,6% de gelrite.

El medio de infección (IM) contenía sales MS de potencia mitad y vitaminas con 2 mg/l de 2,4-D, 10 g/l de glucosa, 60 g/l de maltosa, 50 mg/l de ácido ascórbico, 1 mg/ml de MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico) y 40 mg/l de acetosiringona (AS). El pH del medio fue ajustado a 5,2 con KOH 1 N. El medio de cocultivo (CM) era el mismo que el IM (excluyendo el ácido ascórbico) y fue solidificado mediante la adición de un 0,6% de gelrite.

El medio de infección fue esterilizado por filtración, mientras que todos los demás medios fueron autoclavados. Después de la esterilización se añadió AS disuelta en DMSO (400 mg/ml).

Se hicieron crecer cultivos de *Agrobacterium* (cepas AGL1, EHA105, A4, etc.) con los plásmidos binarios apropiados durante tres días a temperatura ambiente en placas de LB2N (medio LB con 2 g/l de NaCl y un 1,5% de agar) suplementadas con los antibióticos apropiados. Las bacterias fueron raspadas de las placas y resuspendidas en IM en tubos Falcon de 50 ml. Los tubos fueron fijados horizontalmente a una plataforma agitadora y agitados a baja velocidad durante 4 a 5 horas a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica de la suspensión y se ajustó la DO600 a 1,0.

Fragmentos de los callos fueron incubados en la suspensión de *Agrobacterium* durante 3 horas a temperatura ambiente y transferidos al CM solidificado con gelrite con 60 g/l de maltosa.

Después de 3 días de cultivo en CM, los callos fueron lavados cinco veces con medio MS de potencia mitad con 60 g/l de sacarosa y transferidos al CM solidificado con gelrite con 60 g/l de sacarosa y 5 mg/l de fosfinotricina (PPT) y, en algunos casos, 150 mg/l de timentina. Los callos resistentes a fosfinotricina desarrollados bajo selección fueron sembrados en el medio de regeneración con 5 mg/l de PPT.

Los tejidos de las plantas PPT<sup>R</sup> que se regeneraron fueron inicialmente analizados visualmente para determinar la ausencia de un gen IPT funcional que produjera la formación adventicia de vástagos en medio libre de hormonas (Ooms y col., 1983, *Theor. Appl. Genet.*, 66, 169-172; Smigocki, A.C. y Owens, L.D., 1989, *Plant Physiol.*, 91, 808-811; Smigocki, A.C. y Owens, L.D., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5131-5135). Se llevaron a cabo procesos de selección secundaria por plantas portadoras de la región de ADN-T ensamblada *in planta* (Figura 9) y por la ausencia de regiones de ADN-T procedentes de pICH12022 y pICH12031 utilizando análisis de PCR del tejido de las plantas PPT<sup>R</sup> para detectar la presencia de secuencias de los genes de la integrasa de PhiC31 y de IPT.

# REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir plantas o células vegetales transgénicas transformadas de manera estable en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés y capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés, comprendiendo dicho proceso

(a) la provisión a células vegetales o plantas de al menos dos vectores diferentes, donde

(i) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que se recombinen entre sí mediante recombinación específica de sitio en dichas células vegetales con el fin de producir un producto de recombinación no replicante que contenga dicha secuencia de ADN de interés,

(ii) dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para que integren dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma,

(iii) dicha secuencia de ADN de interés contiene porciones de la secuencia de al menos dos de dichos al menos dos vectores diferentes, siendo dichas porciones de la secuencia necesarias para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés; y

(b) la selección de plantas o células vegetales que expresen dicha función de interés.

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que dichos al menos dos vectores son proporcionados a dichas células vegetales mediante administración mediada por *Agrobacterium*.

3. El proceso de la reivindicación 2, en el que cada uno de dichos al menos dos vectores diferentes es proporcionado por una célula o cepa de *Agrobacterium* diferente.

4. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o todos de dichos al menos dos vectores diferentes contiene(n) un gen autónomo de citoquinina funcional, mientras que dicha secuencia de ADN de interés carece de un gen autónomo de citoquinina funcional.

5. El proceso de la reivindicación 1, en el que dichos al menos dos vectores son proporcionados a dichas células vegetales mediante transferencia directa del ácido nucleico.

6. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (a) comprende la provisión de una recombinasa específica de sitio específica para sitios de recombinación en dichos al menos dos vectores diferentes.

7. El proceso de la reivindicación 6, en el que dicha recombinasa específica de sitio es proporcionada mediante la inclusión de una secuencia expresable que codifique dicha recombinasa en un vector de dichos al menos dos vectores diferentes.

8. El proceso de la reivindicación 7, en el que la expresabilidad de dicha secuencia que codifica dicha recombinasa es destruida por dicha recombinación específica de sitio.

9. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho cromosoma es seleccionado del grupo siguiente: un cromosoma nuclear, un cromosoma plastídico o un cromosoma mitocondrial.

10. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés tenga secuencias limítrofes de ADN-T que faciliten la integración de dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma.

11. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés contenga secuencias de homología que faciliten la integración de dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma mediante recombinación homóloga.

12. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados para introducir dicha secuencia de ADN de interés en dicho cromosoma mediante integración específica de sitio.

13. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa (b) comprende la selección de plantas o células vegetales que tengan dicha secuencia de ADN de interés integrada en dicho cromosoma.

14. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa (b) comprende la selección de células o plantas en las cuales haya tenido lugar dicha recombinación específica de sitio entre dichos al menos dos vectores.

15. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dichos al menos dos vectores diferentes son adaptados de tal manera que dicha secuencia de ADN de interés contenga un gen marcador seleccionable o una secuencia que

permita en la etapa (b) la selección de plantas o células vegetales transformadas que contengan dicha secuencia de ADN de interés.

16. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que una porción de la secuencia de uno de dichos al menos dos vectores diferentes contiene un marcador seleccionable bajo el control traduccional de un elemento sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

17. El proceso de la reivindicación 16, en el que dicho marcador seleccionable no puede ser transcrito en dichas células vegetales a partir de uno de dichos al menos dos vectores diferentes, sino que es colocado por dicha recombinación específica de sitio bajo el control de elementos genéticos que permiten la transcripción de dicho marcador seleccionable.

18. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la etapa (b) comprende un proceso de selección por la ausencia de dichos al menos dos vectores diferentes y/o de productos de recombinación de los mismos, con la excepción de los productos de recombinación que contengan dicha secuencia de ADN de interés.

19. El proceso de la reivindicación 18, en el cual

(a) al menos uno de dichos al menos dos vectores diferentes o

(b) los productos de recombinación de dicha recombinación específica de sitio que no contienen dicha secuencia de ADN de interés

contienen un gen marcador contraseleccionable u otra secuencia que permita la selección frente a las células transformadas que contienen dichos vectores según se definió en (a) o dichos productos de recombinación según se definió en (b).

20. El proceso de la reivindicación 19, en el que dicho gen marcador contraseleccionable o dicha otra secuencia que permite la selección frente a las células transformadas que contienen dichos vectores, está bajo el control traduccional de un elemento sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

21. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 20, en el que dicha expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés comprende ajuste en cis mediado por un intrón.

22. El proceso de la reivindicación 21, en el cual

- un primer vector de dichos al menos dos vectores diferentes contiene una primera porción de la secuencia que contiene:

una primera parte de una secuencia que codifica la función que va a ser expresada y, corriente abajo de la misma, la parte 5' de un intrón, y

- un segundo vector de dichos al menos dos vectores diferentes contiene una segunda porción de la secuencia que contiene:

una segunda parte de una secuencia que codifica la función que va a ser expresada y, corriente arriba de la misma, la parte 3' de un intrón.

23. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 22, en el que se proporcionan tres o más vectores diferentes a dicha planta o a dichas células vegetales en la etapa (a) y se producen dos o más plantas o células vegetales transgénicas diferentes, teniendo dichas plantas o células vegetales transgénicas diferentes secuencias de ADN de interés diferentes integradas en un cromosoma.

24. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 22, en el que se proporcionan a dichas células vegetales dos vectores diferentes y dicha secuencia de ADN de interés contiene una porción de la secuencia de cada uno de estos dos vectores.

25. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende las etapas (A) y (B) siguientes:

(A) el suministro a plantas o células vegetales de una mezcla de

(i) un conjunto de m vectores primarios, teniendo cada uno de ellos una porción de secuencia primaria seleccionada del conjunto ( $a_1, a_2, \dots, a_m$ ) y

(ii) un conjunto de n vectores secundarios, teniendo cada uno de ellos una porción de secuencia secundaria seleccionada del conjunto ( $b_1, b_2, \dots, b_n$ ),

donde

m y n son independientes entre sí y son ambos números enteros  $>1$ ,

dichos vectores primarios y dichos vectores secundarios son adaptados de tal manera que cada miembro de dicho conjunto de vectores primarios pueda recombinarse con cualquier miembro de dicho conjunto de n vectores secundarios mediante recombinación específica de sitio para producir productos de recombinación que contienen diferentes secuencias de ADN de interés,

cada secuencia de ADN de interés contiene un miembro de dicho conjunto de porciones de secuencias primarias y un miembro de dicho conjunto de porciones de secuencias secundarias,

siendo ambos miembros de dichas porciones de secuencias necesarios para la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés,

dichos vectores primarios y dichos vectores secundarios son adaptados para que integren dicha secuencia de ADN de interés en un cromosoma,

(B) la selección de las plantas o células vegetales transformadas que expresen una función de interés a partir de una secuencia de ADN de interés.

26. El proceso de una de las reivindicaciones 1 a 23 ó 25, que comprende las etapas (A) y (B) siguientes:

(A) el suministro a plantas o células vegetales de una mezcla de

- (i) un vector primario que tiene una porción de secuencia primaria  $a_1$  y
- (ii) un conjunto de n vectores secundarios, teniendo cada uno de ellos una porción de secuencia secundaria seleccionada del conjunto  $(b_1, b_2, \dots, b_n)$ ,

donde

n es un número entero  $>1$ ,

dicha porción de secuencia primaria  $a_1$  es necesaria para expresar la función de una porción de secuencia secundaria  $(b_1, b_2, \dots, b_n)$ ,

dicho vector primario y dichos vectores secundarios son adaptados de tal manera que dicho vector primario pueda recombinarse con cualquier miembro de dicho conjunto de n vectores secundarios mediante recombinación específica de sitio para producir productos de recombinación que contienen diferentes secuencias de ADN de interés de tipo  $(a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_1b_n)$  o del tipo  $(b_1a_1, b_2a_1, \dots, b_na_1)$ ,

dicho vector primario y dichos vectores secundarios son adaptados para que integren dichas secuencias de ADN de tipo  $(a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_1b_n)$  o de tipo  $(b_1a_1, b_2a_1, \dots, b_na_1)$  en un cromosoma,

(B) la selección de las plantas o células vegetales transformadas que expresen una función de interés a partir de una secuencia de ADN de interés.

27. El proceso de la reivindicación 25 ó 26, que comprende además la determinación de una característica fenotípica de una planta o una célula vegetal transformada seleccionada en la etapa (B) debido a una función de

una porción de secuencia primaria y/o

una porción de secuencia secundaria y/o

una combinación de una porción de secuencia primaria y una porción de secuencia secundaria.

28. Plantas transgénicas o partes de las mismas como semillas transformadas en un cromosoma con una secuencia de ADN de interés y capaces de expresar una función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés,

conteniendo dicha secuencia de ADN de interés:

- una primera porción de secuencia que contiene una primera parte de una secuencia que codifica la función que va a ser expresada y, corriente abajo de la misma, la parte 5' de un intrón, y
- una segunda porción de secuencia que contiene una segunda parte de una secuencia que codifica una función que va a ser expresada y, corriente arriba de la misma, la parte 3' de un intrón,

## ES 2 334 915 T3

siendo dicha planta transgénica o dichas partes de la misma producibles mediante el proceso de la reivindicación 22 y comprendiendo la expresión de dicha función de interés a partir de dicha secuencia de ADN de interés un ajuste en *cis* mediado por un intrón.

5        29. Las plantas transgénicas o partes de las mismas como semillas de acuerdo con la reivindicación 28, donde dicha secuencia de ADN contiene, entre dichas porciones de secuencias, un sitio de recombinación específica de sitio o una región resultante de la recombinación específica de sitio entre sitios de recombinación específica de sitio.

10       30. Las plantas transgénicas o partes de las mismas como semillas de acuerdo con la reivindicación 29, donde dicho sitio de recombinación específica de sitio o dicho sitio resultante de recombinación específica de sitio entre los sitios de recombinación específica de sitio es seleccionado de loxP, attR, attL.

15       31. Las plantas transgénicas o partes de las mismas como las semillas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en las que dicha secuencia de interés contiene secuencias limítrofes del ADN-T

32. Las plantas transgénicas o partes de las mismas de acuerdo con la reivindicación 28, en las que todas las secuencias codificadoras y/o las secuencias expresables de dicha secuencia de interés son de origen vegetal.

20       33. Utilización de una planta o de células vegetales transgénicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32 para generar una segunda planta transgénica o segundas células vegetales transgénicas conteniendo ADN extracromosómico, donde dicha generación comprende: la inducción de la formación de dicho ADN extracromosómico a partir de dicha secuencia de ADN de interés integrada en la planta o en las células vegetales transgénicas de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32.

25       34. Utilización de acuerdo con la reivindicación 33, en la que dicha inducción comprende el suministro de un factor a dichas plantas o células vegetales transgénicas, en las que dicho factor puede desencadenar la formación de dicho ADN extracromosómico a partir de dicha secuencia de ADN de interés.

30       35. Utilización de acuerdo con la reivindicación 34, en la que dicho suministro de dicho factor comprende el cruce de dicha planta o de dichas células vegetales con una planta o con células vegetales que tengan codificado dicho factor en su genoma.

35       36. Una biblioteca de plantas o de semillas de plantas obtenidas u obtenibles de acuerdo con una de las reivindicaciones 25 a 27.

40

45

50

55

60

65

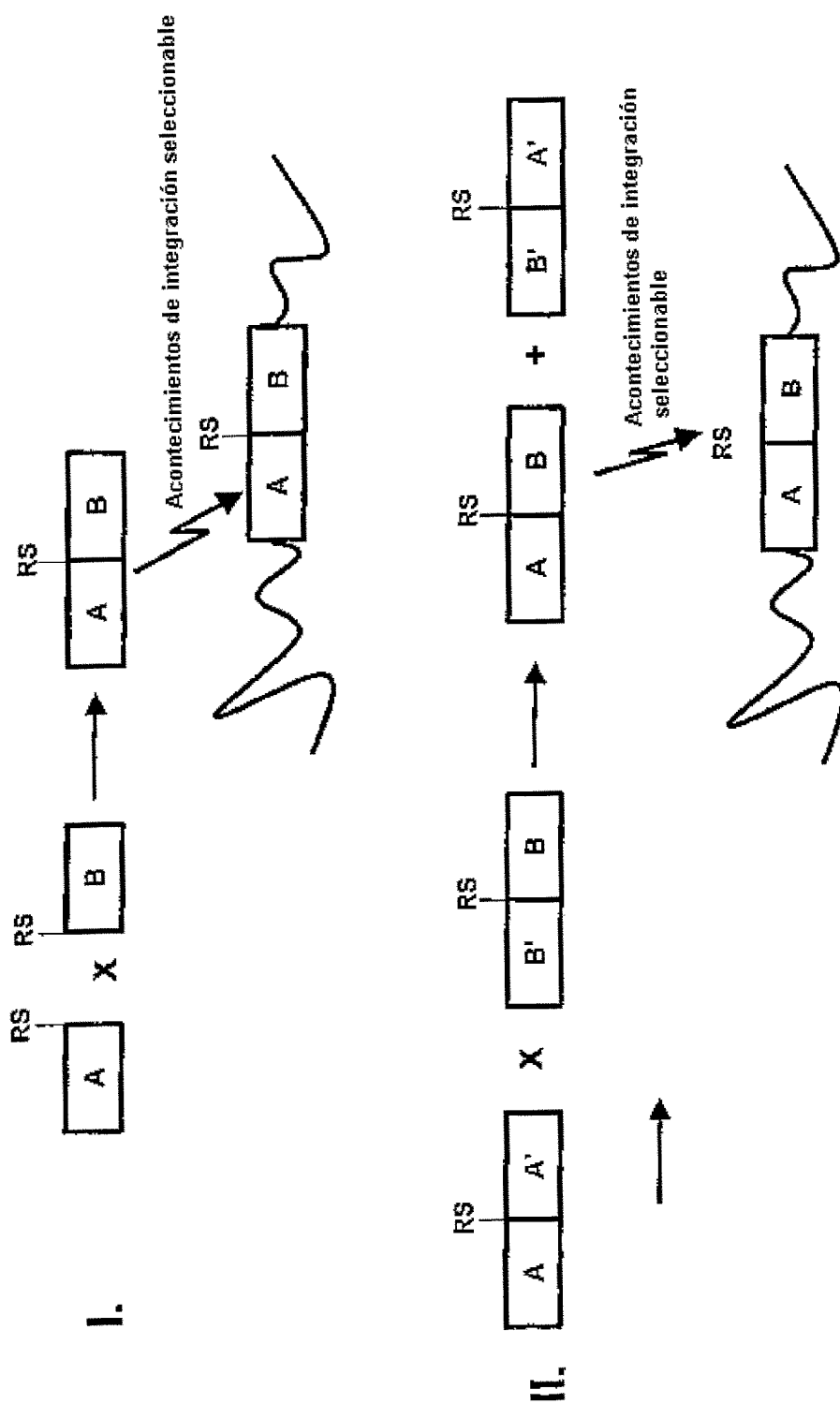


Fig. 1A

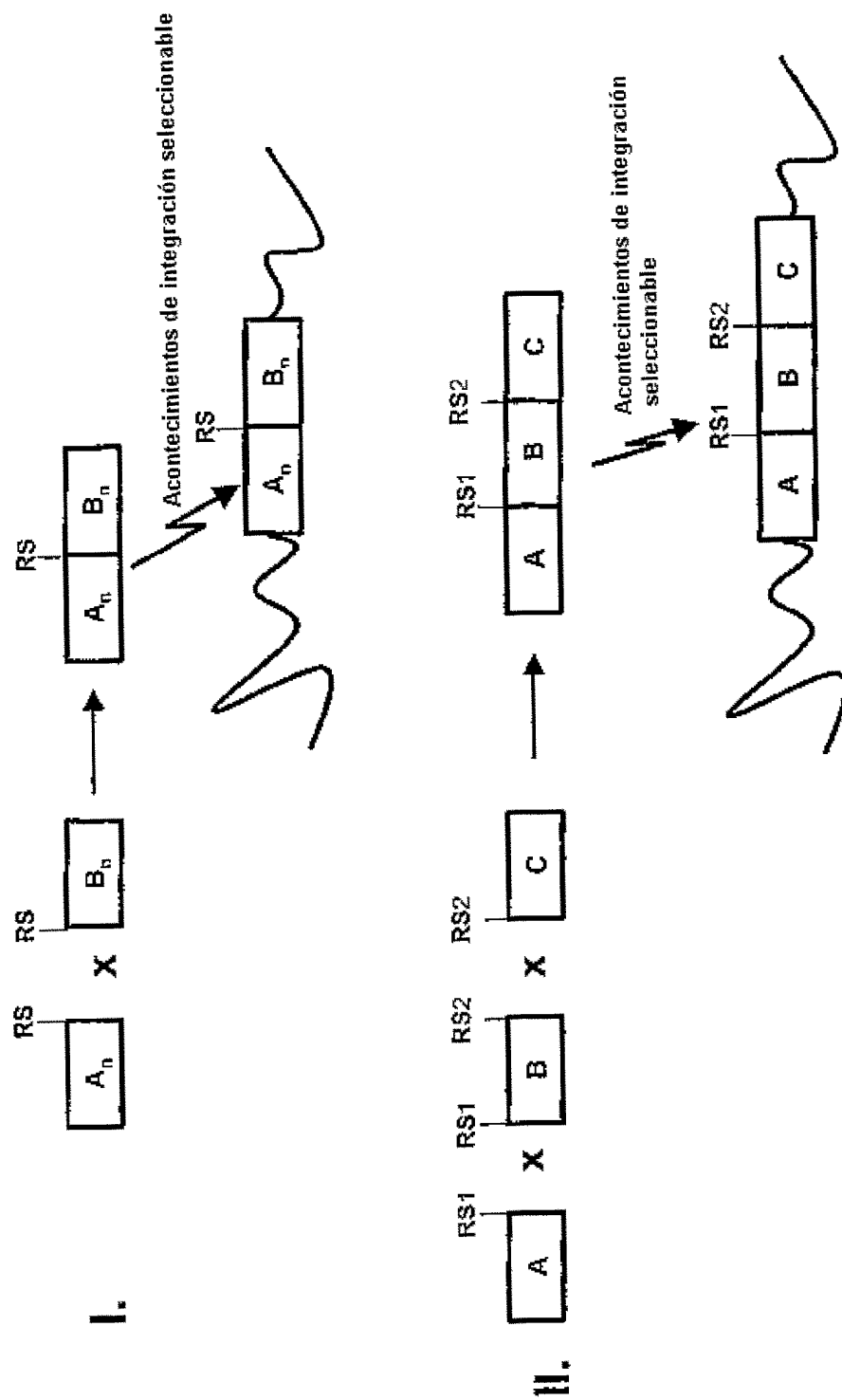
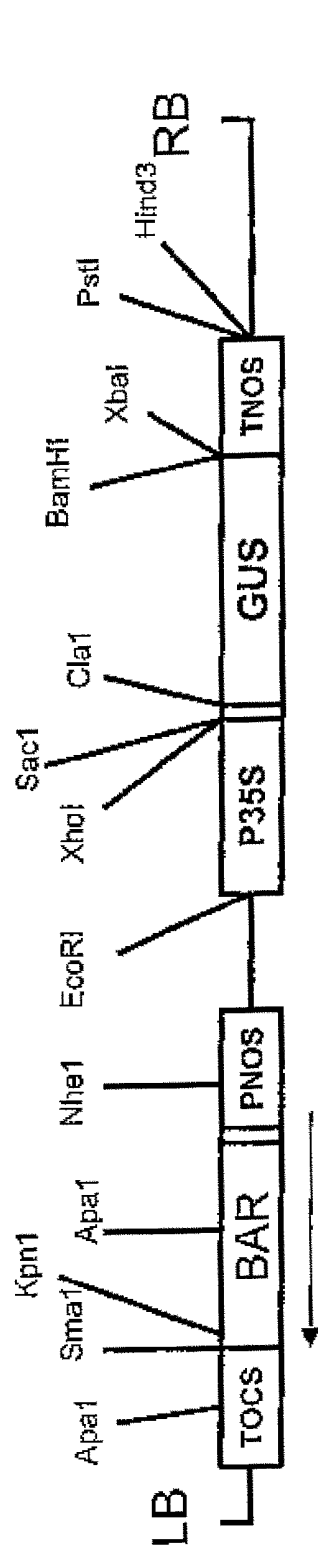


Fig. 1B

# pICBV19 (carb)



# pICH10605

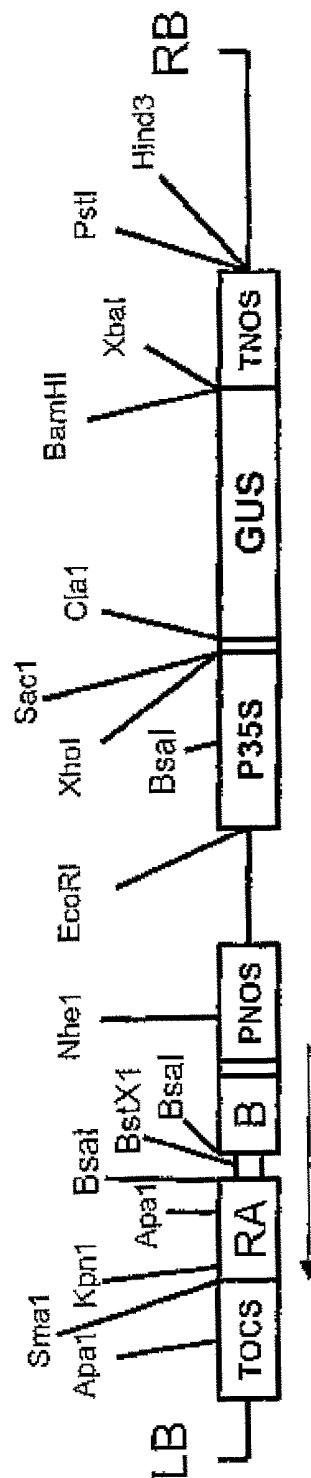
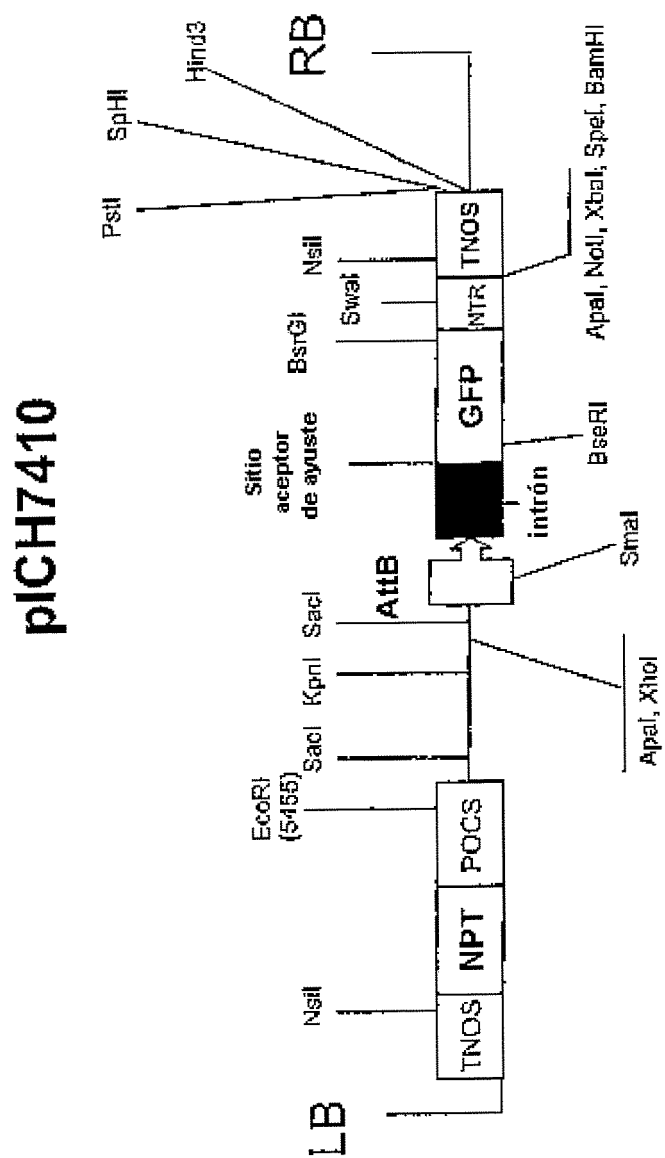


Fig. 2



**Fig. 3**

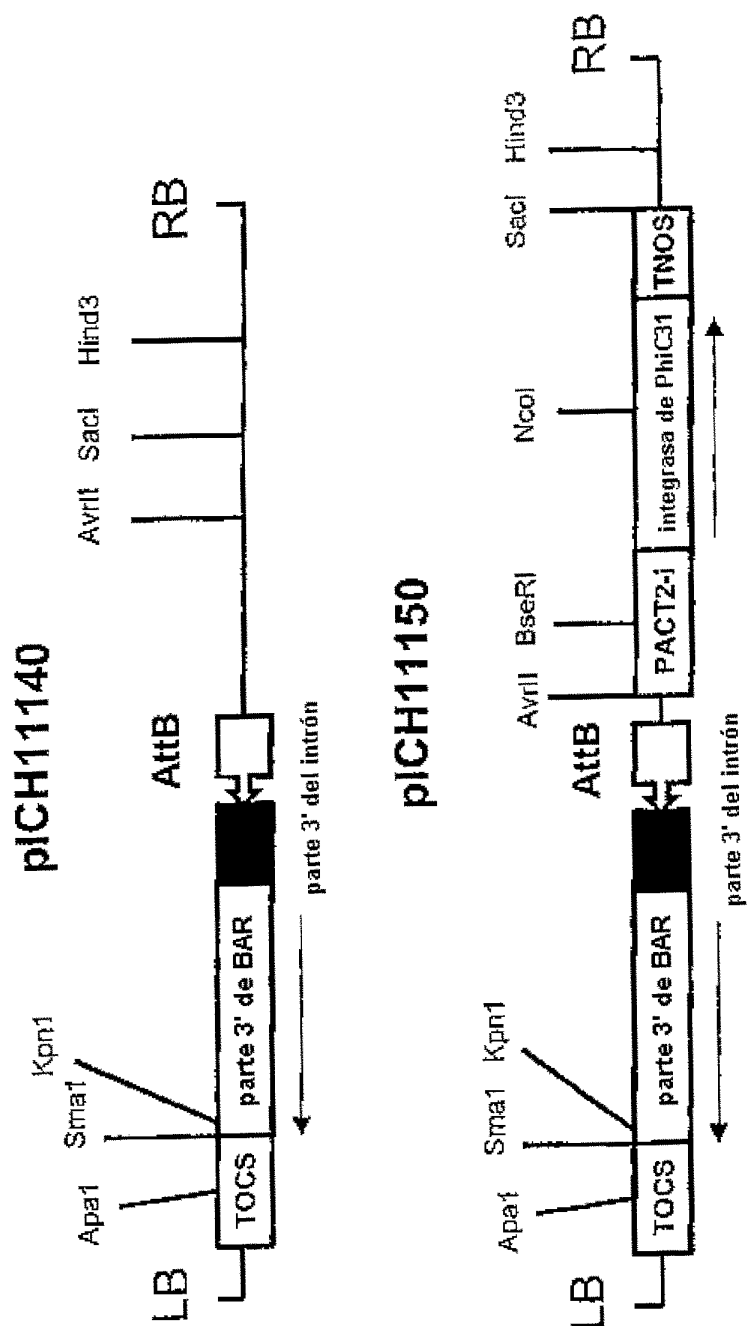
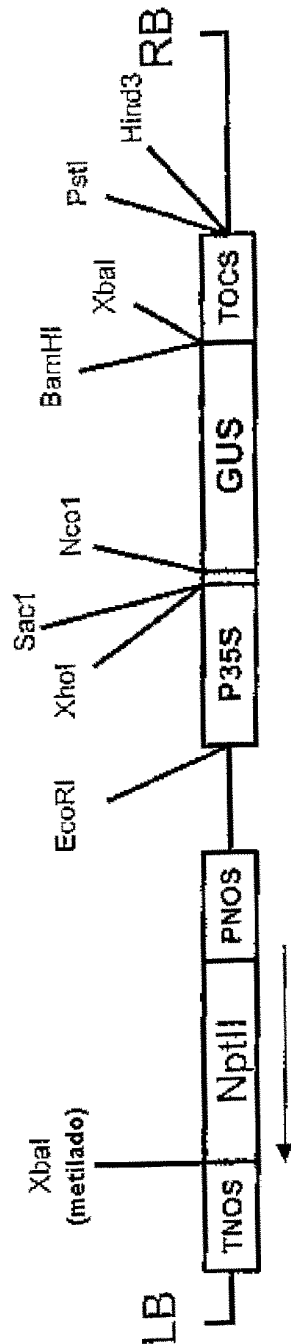


Fig. 4

# pICBV16



# pICH 8430

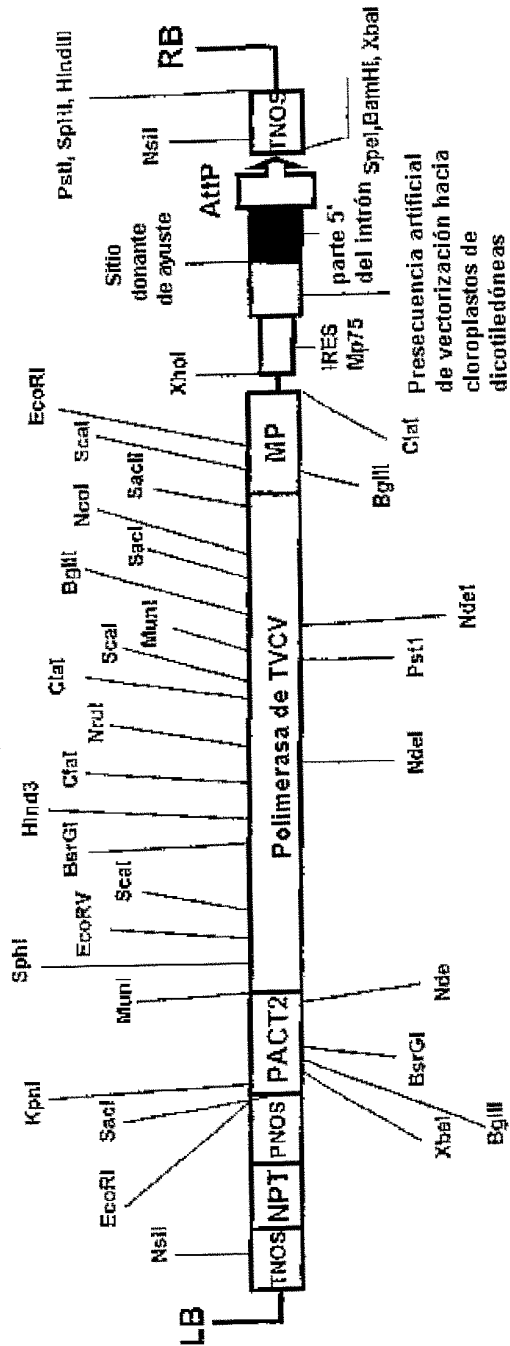


Fig. 5

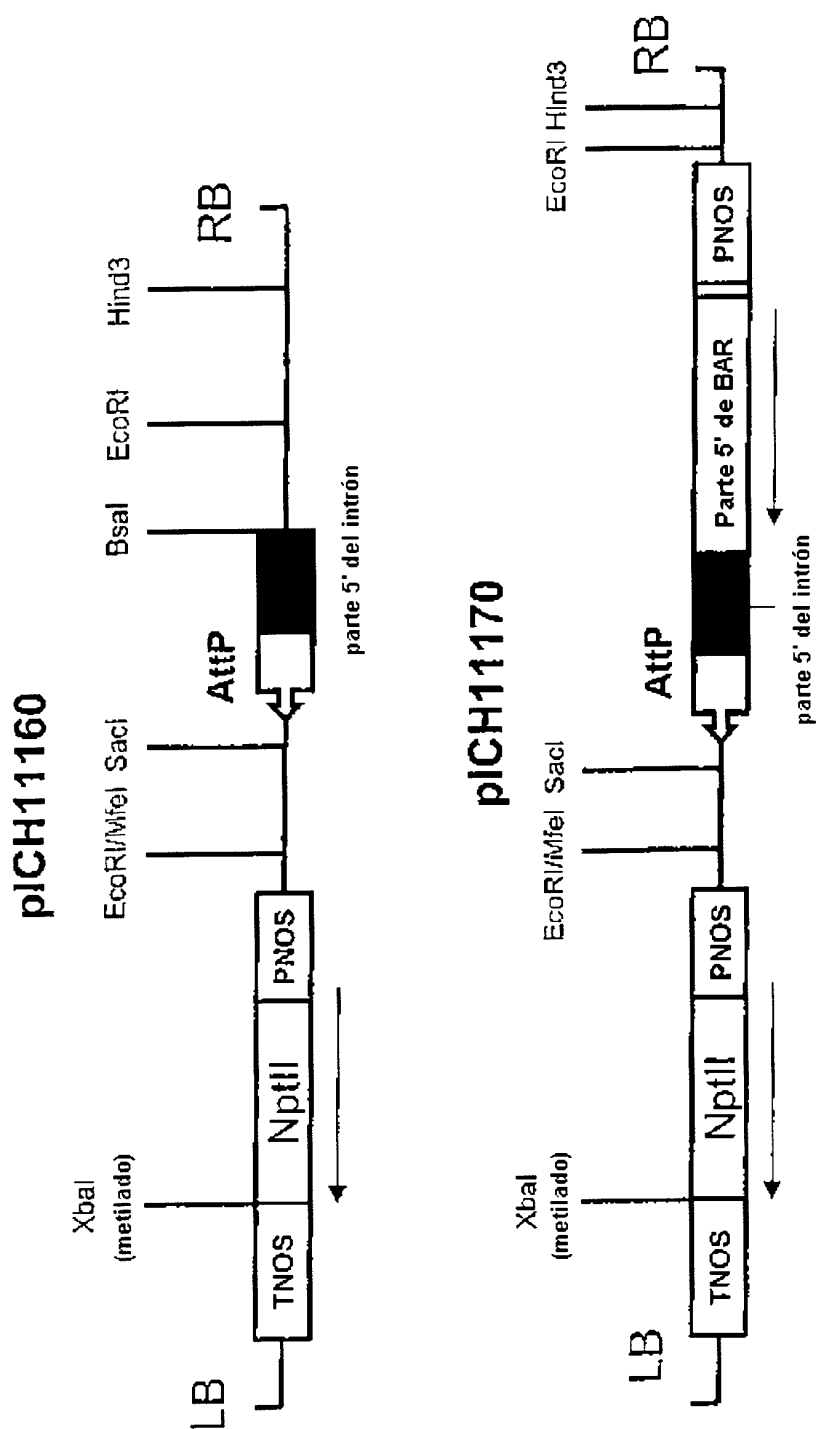


Fig. 6

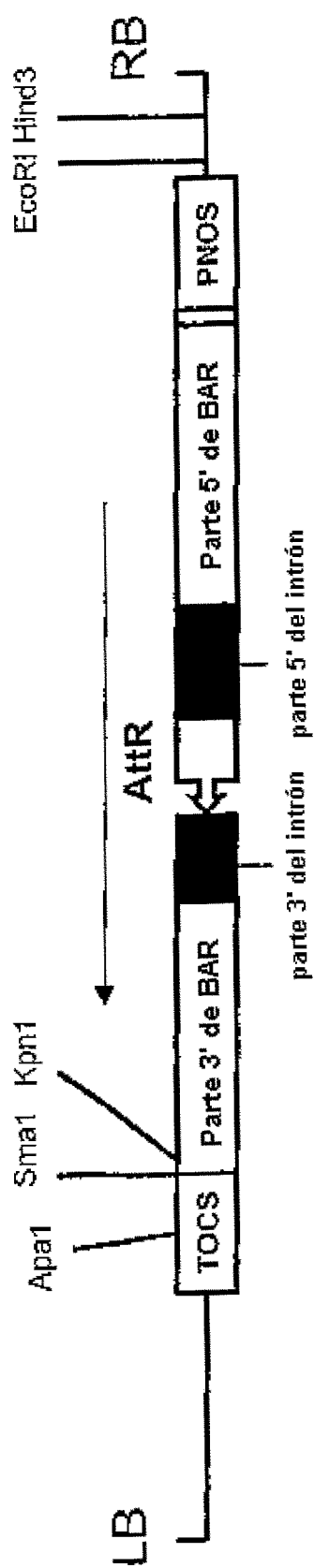


Fig. 7

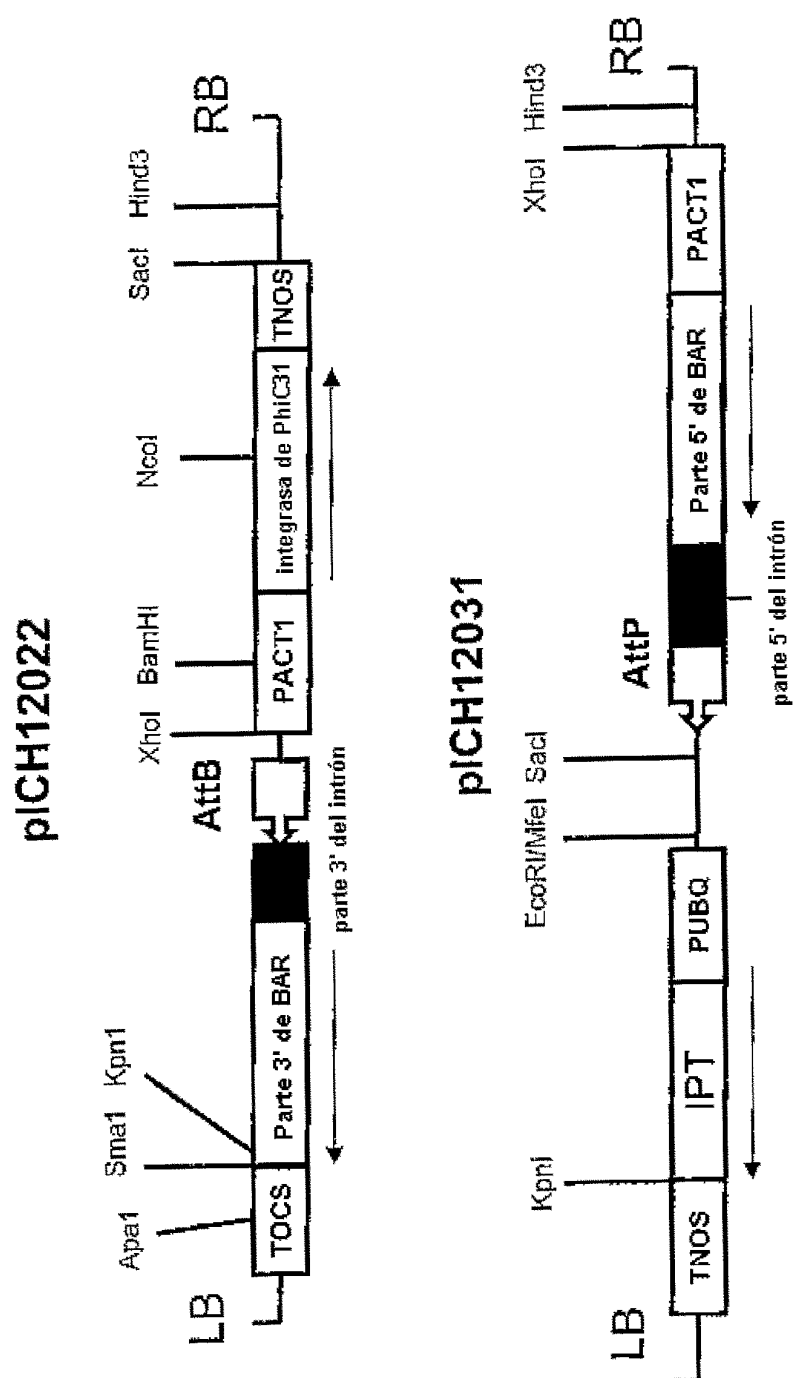


Fig. 8

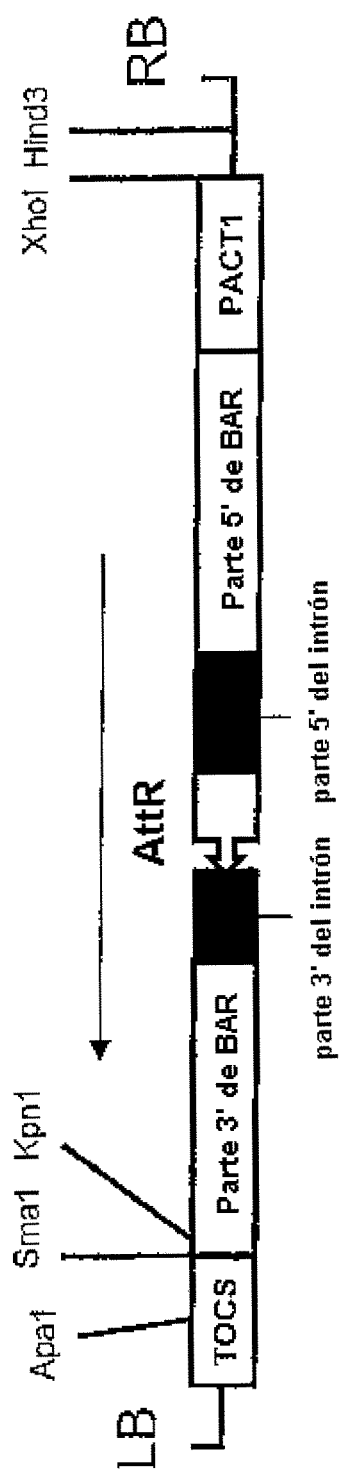


Fig. 9

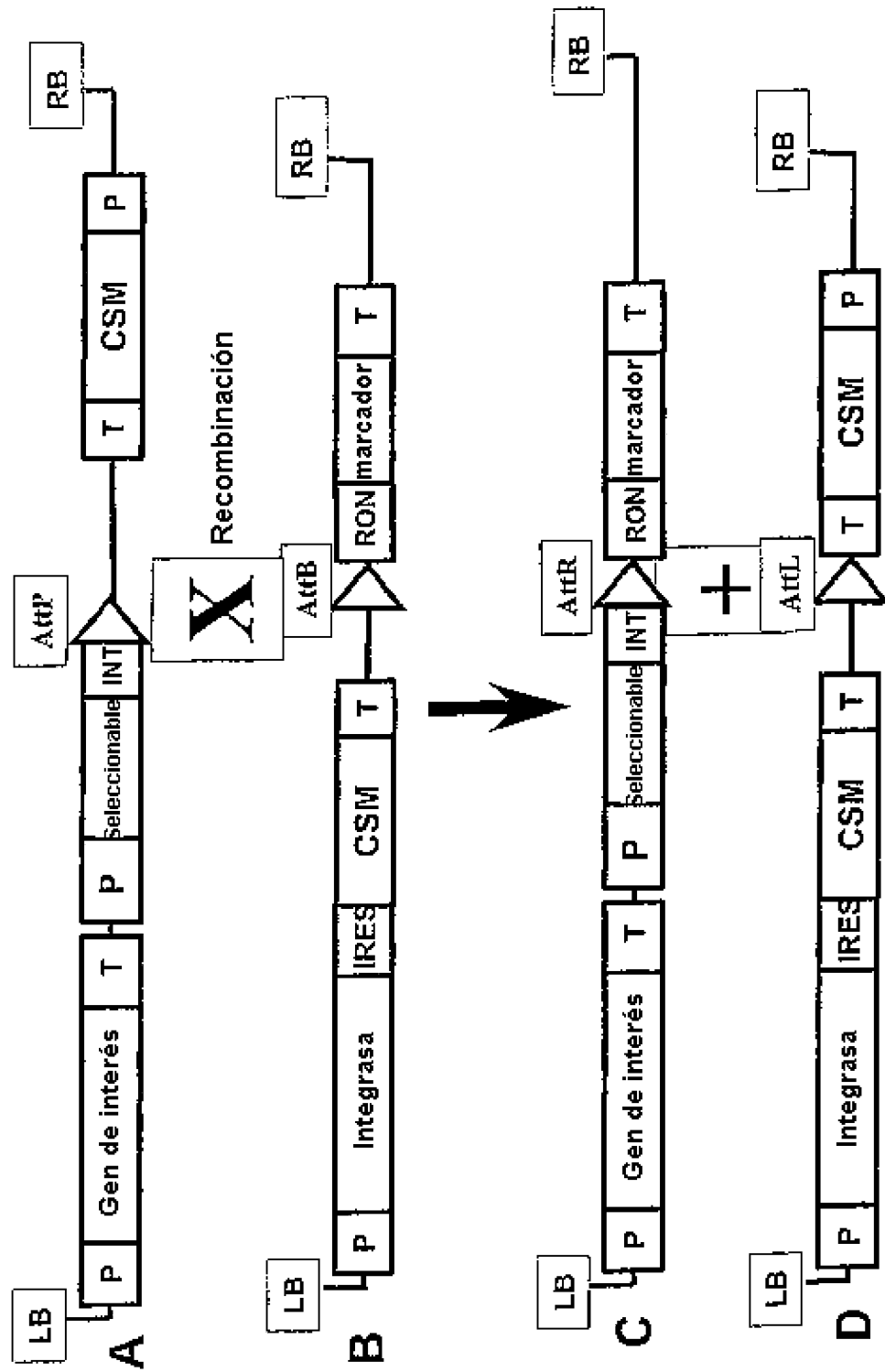


Fig. 10

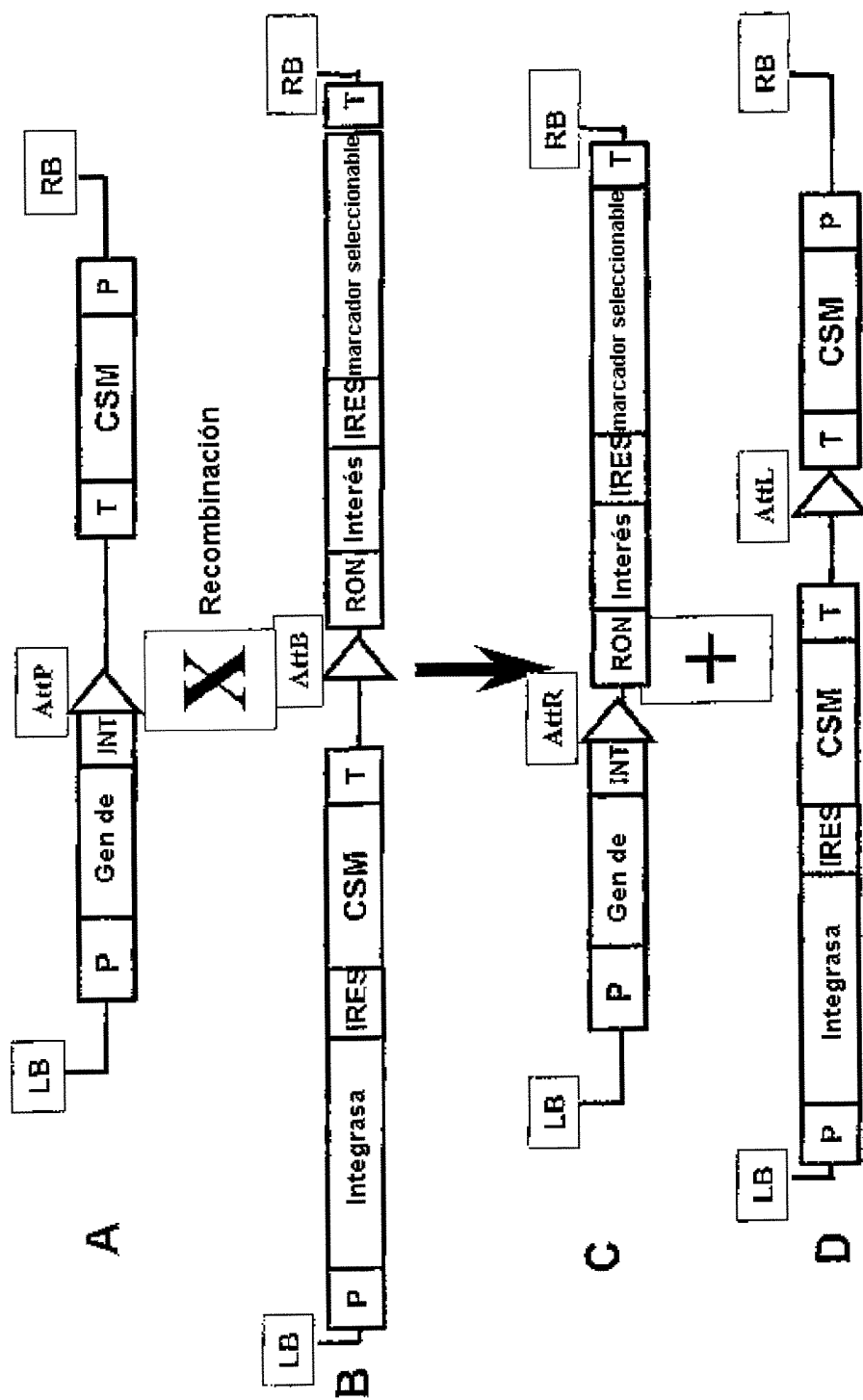


Fig. 11

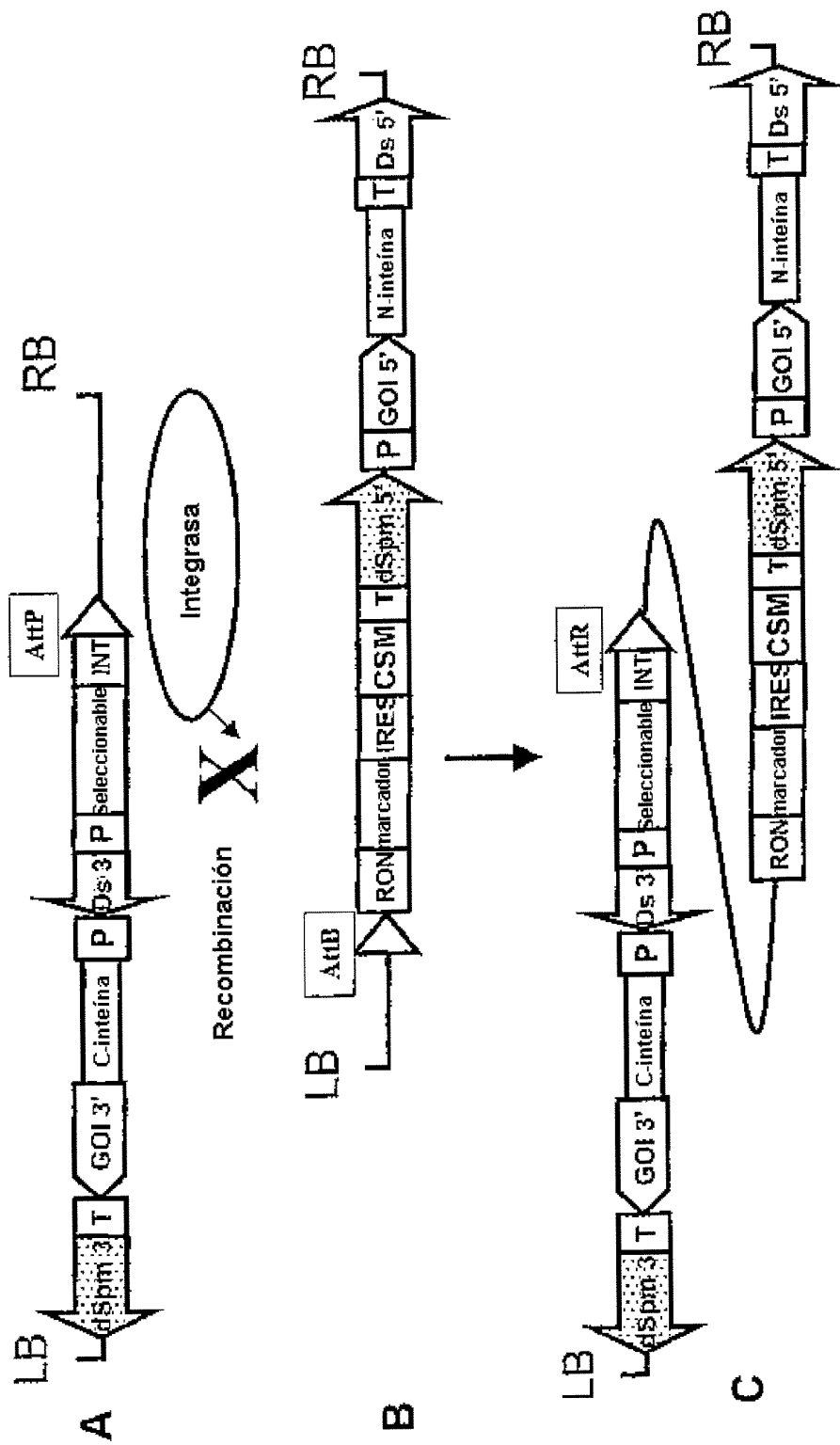


Fig. 12

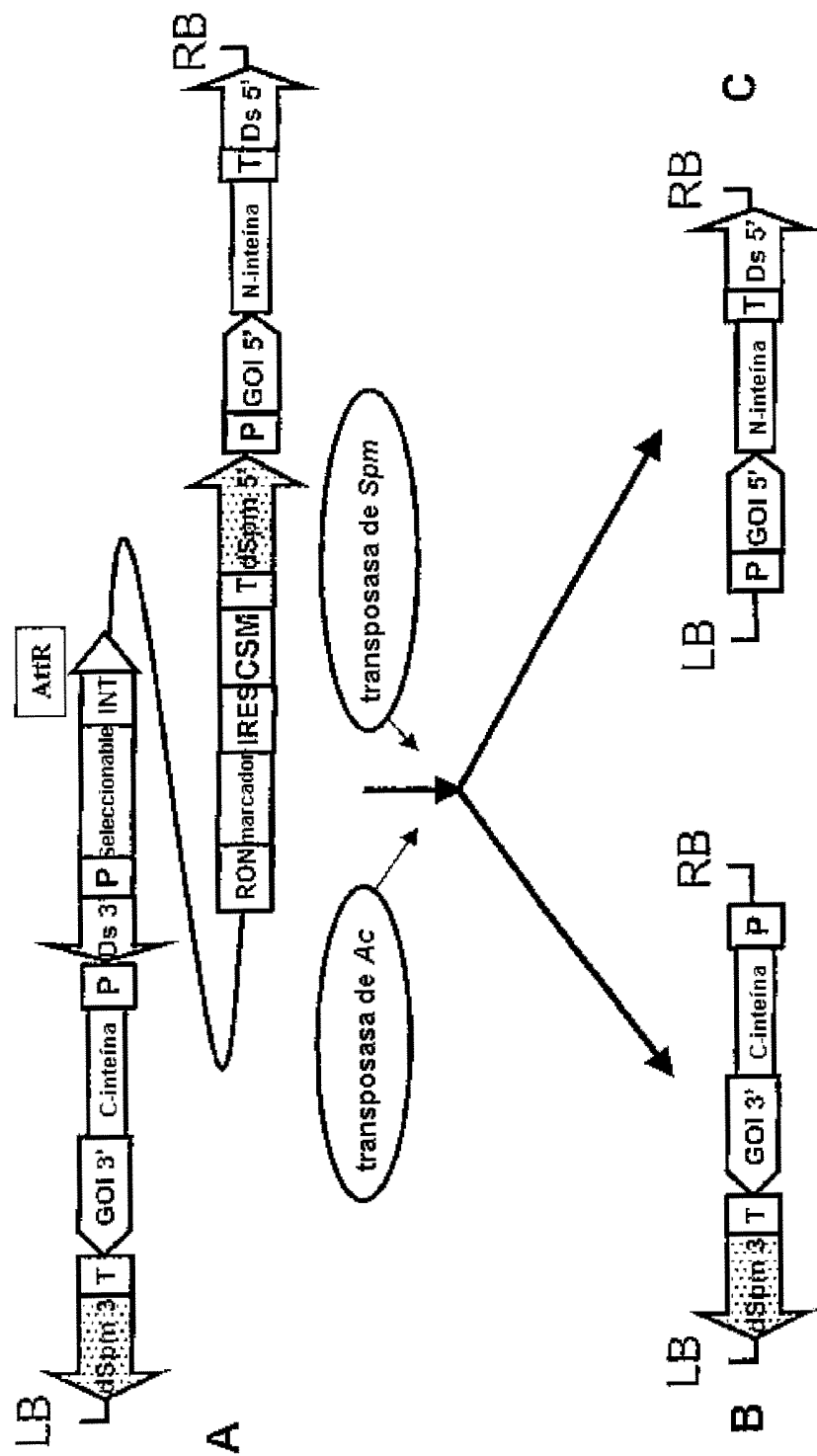


Fig. 13

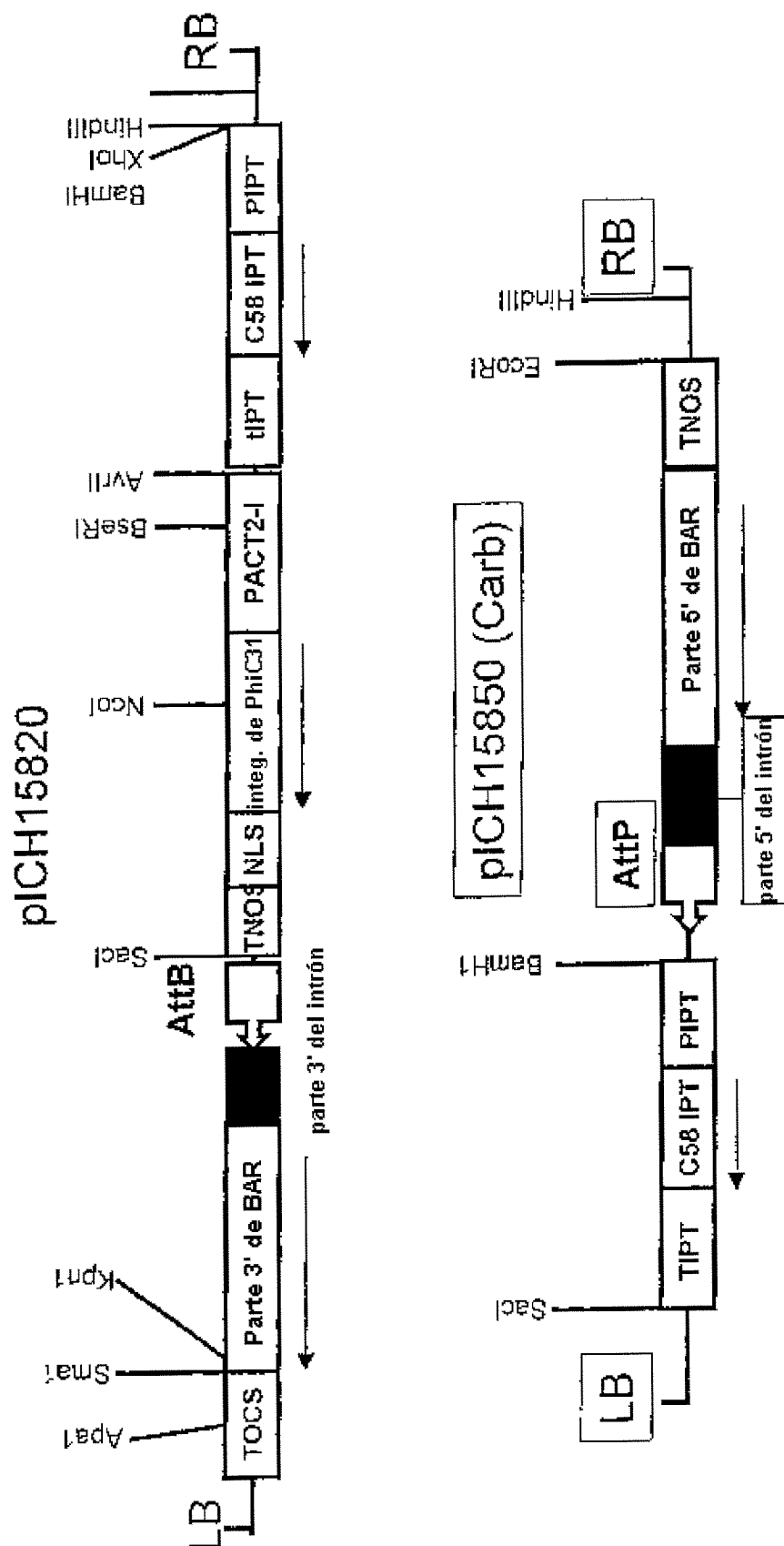


Fig. 14



Fig. 15

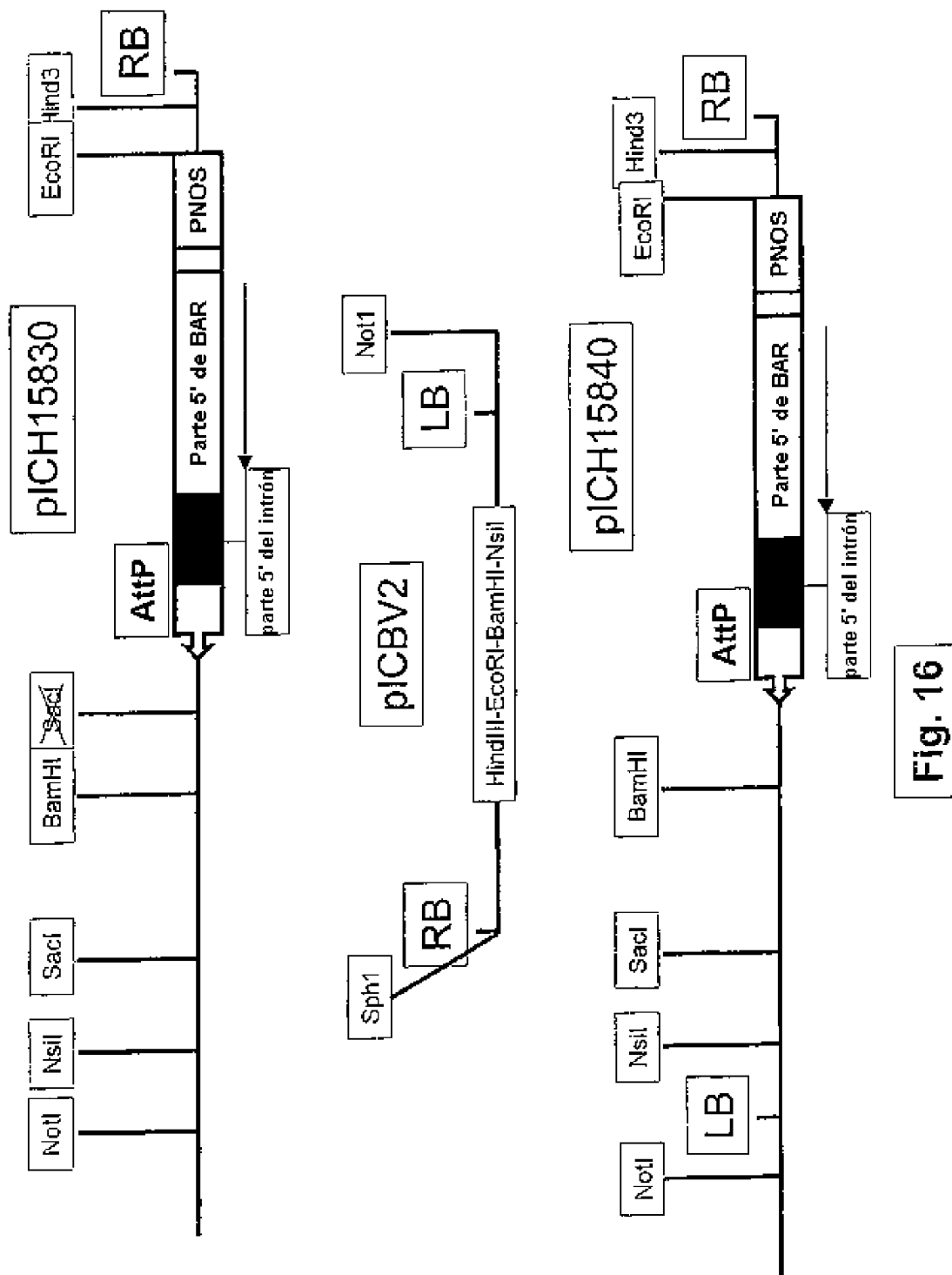


Fig. 16

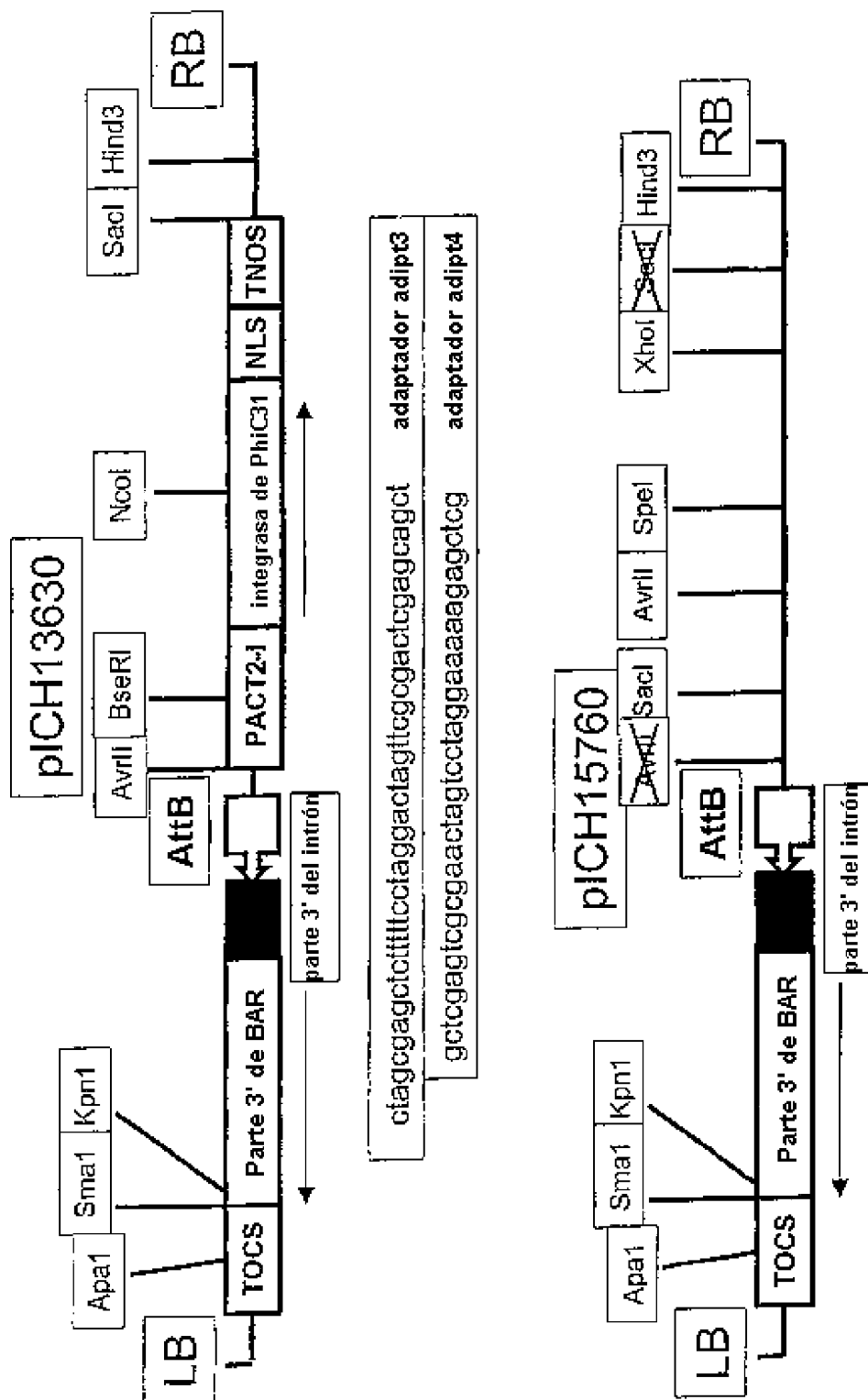


Fig. 17 (A)

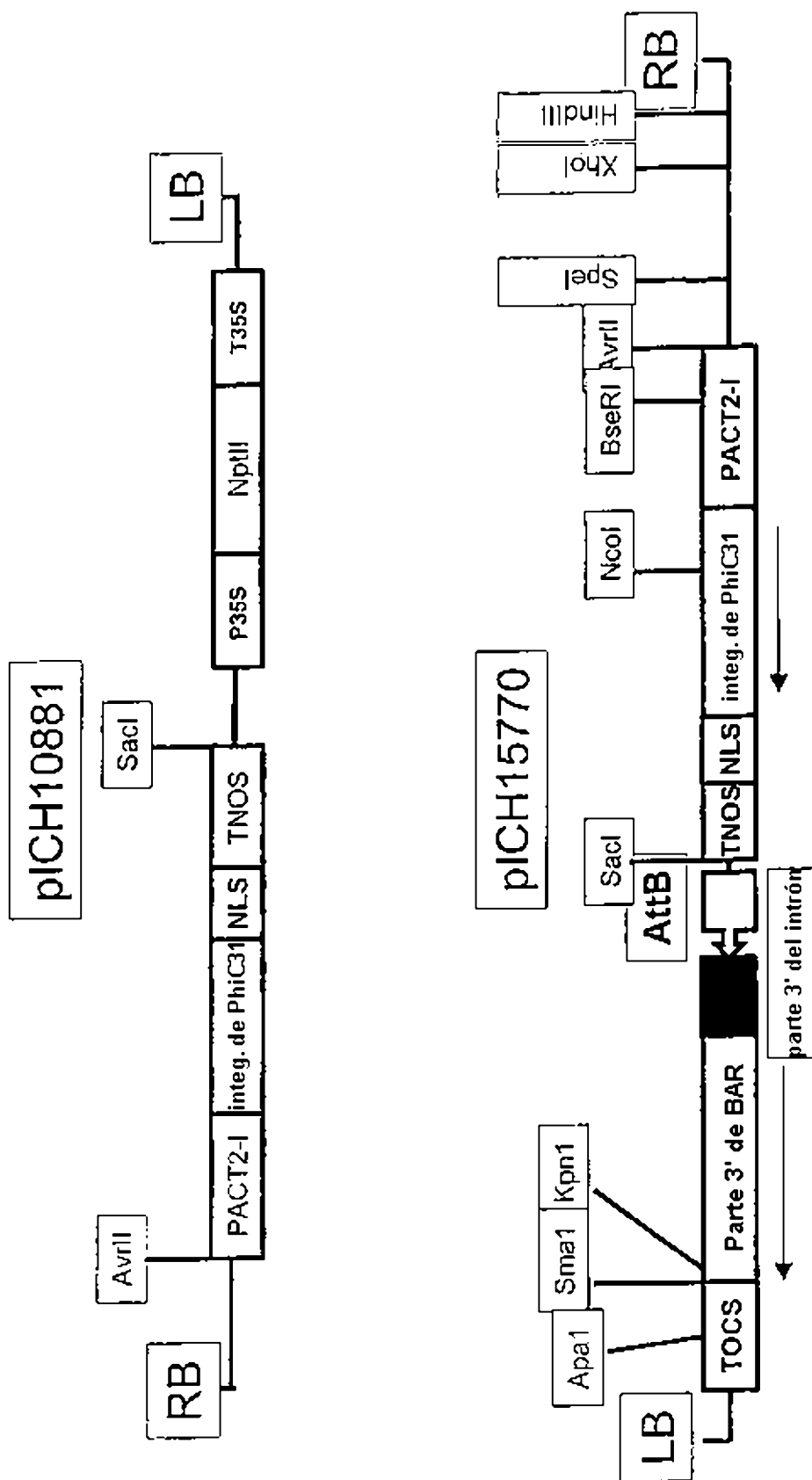


Fig. 17 (B)