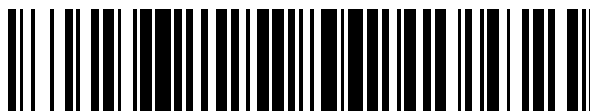


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 823**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**A01H 5/00** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2006** **E 14163682 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 2792750**

54 Título: **Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**18.03.2020**

73 Titular/es:

**22ND CENTURY LIMITED, LLC (100.0%)**  
**9530 Main Street**  
**Clarence, NY 14031, US**

72 Inventor/es:

**KAJIKAWA, M. y**  
**HASHIMOTO, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 748 823 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

Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y la regulación de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por lo tanto, la invención se refiere, por ejemplo, a metodología y construcciones para aumentar el nivel de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*. También se describen células que se manipulan por ingeniería genética para producir alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados, cuando de otro modo no los producirían.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 [0002] Actualmente se conocen varias enzimas de la biosíntesis de nicotina. Por ejemplo, se ha clonado el gen de la quinolato-fosforribosiltransferasa de tabaco (*QPT*), véanse la patente de los EE. UU. n° 6.423.520 y Sinclair y col., Plant Mol. Biol. 44: 603-17 (2000), y su supresión proporciona reducciones significativas de nicotina en plantas transgénicas de tabaco. Xie y col., Recent Advances in Tobacco Science 30: 17-37 (2004). Igualmente, se ha observado que la supresión de una secuencia endógena de putrescina-metiltransferasa (*PMT*) reduce los niveles de nicotina pero aumenta los niveles de anatabina de dos a seis veces. Hibi y col., Plant Cell 6: 723-35 (1994); Chintapakorn y Hamill, Plant Mol. Biol. 53: 87-105 (2003); Steppuhn y col., PLoS Biol. 2:8:e217: 1074-1080 (2004).

[0003] Mientras que los esfuerzos de investigación anteriores se han centrado en el uso de enzimas de la biosíntesis de nicotina para reducir la nicotina en las plantas, muy pocas investigaciones han abordado el papel de las enzimas de la biosíntesis de nicotina en el aumento de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Esta falta de datos de regulación por aumento puede atribuirse al hecho de que la sobreexpresión de un gen conocido de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos, como *PMT* o *QPT*, no tiene necesariamente que aumentar la producción y acumulación de metabolitos secundarios en la planta. Es decir, no necesariamente porque la regulación por disminución de un gen de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos reduzca la producción y acumulación de alcaloides, la sobreexpresión de este mismo gen de biosíntesis de alcaloides nicotínicos va a aumentar la producción y acumulación de alcaloides nicotínicos.

[0004] Debido a la escasez de investigación, existe la necesidad de identificar genes que aumenten la biosíntesis y acumulación de la nicotina. Por ejemplo, dado que los alcaloides nicotínicos desempeñan un papel importante en la protección de las plantas contra insectos y herbívoros, probablemente sea ventajoso aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos en una planta huésped. Desde el punto de vista de los herbívoros, el aumento de la síntesis y acumulación de nicotina proporcionará un modo respetuoso con el medio ambiente de intervenir en las interacciones entre planta y plaga.

40 [0005] Desde el punto de vista de la industria tabaquera, en que la nicotina es el componente física y fisiológicamente activo del humo de los cigarrillos, puede ser ventajoso aumentar el contenido de nicotina en el tabaco por ingeniería genética. Los estudios de investigación demuestran que cuando se añade físicamente nicotina adicional al tabaco de los cigarrillos de una fuente externa, los fumadores inhalan menor cantidad de los componentes más dañinos del humo como alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., Psychopharmacology 96: 447-53 (1988), Fagerström, Psychopharmacology 77: 164-67 (1982), Russell, Nicotine and Public Health 15: 265-84 (2000) y Woodman y col., European Journal of Respiratory Disease 70: 316-21 (1987). Asimismo, un informe del Instituto de Medicina (IOM) de los EE. UU. sobre productos potenciales de exposición reducida (PREP) concluyó que otra estrategia general para reducir el daño del tabaco es la retención de nicotina a niveles agradables o adictivos mientras se reducen los componentes más tóxicos. Véase CLEARING THE SMOKE, ASSESSING THE SCIENCE BASE FOR TOBACCO HARM REDUCTION, IOM, en la página 29 (2001); publicación a la que la industria del tabaco normalmente hace referencia como "informe del IOM".

[0006] Además de las aplicaciones más tradicionales para productos con aumento de nicotina, como cigarrillos y otros productos de tabaco, algunos estudios farmacológicos recientes sugieren un papel terapéutico para la nicotina y compuestos relacionados. Por ejemplo, varios grupos de investigación están estudiando actualmente fármacos que reconocen selectivamente receptores de nicotina como un modo de tratar deficiencias cognitivas como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la pérdida de memoria relacionada con la edad. Singer, "The Upside to Nicotine", Technology Review (28 de julio de 2006). Se ha demostrado que ligandos de receptores de acetilcolina, como la nicotina, tienen efectos sobre la atención, la cognición, el apetito, la drogadicción, la memoria, la actividad extrapiramidal, la actividad cardiovascular, el dolor y la motilidad y actividad gastrointestinal. Patente de los EE. UU. n° 5.852.041. Por lo tanto, existen beneficios terapéuticos de la nicotina y los compuestos relacionados y por lo tanto existe la necesidad de mejores procedimientos para su producción.

65 [0007] Por consiguiente, existe una necesidad continua de identificar genes adicionales cuya expresión pueda modificarse para aumentar el contenido de alcaloides nicotínicos en las plantas, en particular de nicotina en plantas

de *N. tabacum*, así como para producir nicotina y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

### **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

5 **[0008]** La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente divulgación que constituyen la presente invención se definen mediante las reivindicaciones.

**[0009]** Existen cuatro genes, *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*, en los que se puede influir para aumentar los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*, así como para sintetizar alcaloides nicotínicos y compuestos  
10 relacionados en células no productoras de nicotina.

**[00010]** En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar los alcaloides nicotínicos, como nicotina, en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de *A622* con respecto a una planta de control. En un aspecto se *A622* se sobreexpresa. En otro aspecto, *NBB1* se sobreexpresa. Según la presente  
15 invención, *A622* y *NBB1* se sobreexpresan. En otra realización más, se sobreexpresan *A622* y *NBB1* y al menos uno de *QPT* y *PMT* también se sobreexpresa. En otra realización más, se sobreexpresan *QPT* y *A622*.

**[00011]** En otro caso, una planta con aumento de nicotina y productos derivados de la misma se producen mediante cualquier procedimiento de sobreexpresión de uno o más de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. En un aspecto  
20 adicional, los productos se seleccionan del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

**[00012]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de alcaloides nicotínicos, que comprende la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no  
25 produce alcaloides nicotínicos. En un caso, la expresión de *NBB1* y *A622* tiene lugar en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentoso, alga, mamífero o insecto.

**[00013]** En otro caso, se produce una planta con aumento de alcaloides nicotínicos por la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos. En otro caso, se  
30 produce un producto con alcaloides nicotínicos mediante la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos.

**[00014]** En otro aspecto, se describe un procedimiento para la producción comercial de un alcaloide nicotínico que comprende (a) proporcionar una pluralidad de células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide  
35 nicotínico de dicha pluralidad.

**[00015]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta, que comprende la sobreexpresión de *PMT* y *QPT* con respecto a una planta de control. En un caso, se produce una  
40 planta con aumento de nicotina. En otro caso, se produce un producto con aumento de nicotina.

**[00016]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de la enzima *NBB1* que comprende la transformación de una célula con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y el cultivo de la célula transformada en condiciones en las que se produce la enzima *NBB1*. En un aspecto, las células  
45 transformadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en células bacterianas, de levadura, hongos filamentosos, algas, plantas verdes y mamíferos.

**[00017]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende a) el cruzamiento de una planta de *Nicotiana* con aumento de nicotina con una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento; y b) la selección de una planta de *Nicotiana* de la  
50 descendencia con aumento de nicotina y del rendimiento. En un caso, se produce una planta con aumento de nicotina y del rendimiento.

**[00018]** En un caso, la planta con aumento de nicotina se produce por: a) transformación de una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; b) regeneración de plantas  
55 transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y c) selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de nicotina con respecto a una planta de control. En otro caso, el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

**[00019]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende: (a) la transformación de una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que  
60 comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta el rendimiento; (b) la regeneración de plantas transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y (c) la selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de  
65

nicotina y un aumento del rendimiento con respecto a una planta de control.

**[00020]** En un caso, la primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica una enzima selecciona del grupo que consiste en QPT, PMT, A622 y NBB1. En otro caso, se produce una planta con aumento de nicotina y del rendimiento.

**[00021]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la nicotina en *N. tabacum* que comprende la sobreexpresión de *PMT* con respecto a una planta de control.

## 10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[00022]**

**FIGURA 1:** análisis de transferencia de ARN de la expresión de *NBB1*

**FIGURA 2:** alineamiento de NBB1 con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (EcBBE)

**FIGURA 3:** árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido NBB1 y proteínas de plantas similares a BBE

**FIGURA 4A:** región de ADN-T de pTobRD2-DEST

**FIGURA 4B:** región de ADN-T de pTobRD2-NBB1ox

**FIGURA 4C:** región de ADN-T de pTobRD2-A622ox

**FIGURA 4D:** región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox

**FIGURA 4E:** región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST

**FIGURA 4F:** región de ADN-T de pE12355SΩ-NBB1

**FIGURA 5A:** análisis de inmunotransferencia de NBB1 en raíces capilares de tabaco

**FIGURA 5B:** análisis de inmunotransferencia de A622 en raíces capilares de tabaco

**FIGURA 6:** contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de TobRD2-NBB1 (TN), TobRD2-A622 (TA) y TobRD2-NBB1-A622 (TNA)

**FIGURA 7:** expresión de la proteína A622 en plantas transgénicas de *A. belladonna*

**FIGURA 8:** plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

**FIGURA 9:** síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

**FIGURA 10:** perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

**FIGURA 11A:** región de ADN-T de pA622pro-DEST

**FIGURA 11B:** región de ADN-T de pA622pro-PMTox

**FIGURE 11C:** región de ADN-T de pTobRD2-PMTox

**FIGURE 11D:** región de ADN-T de pA622pro-QPTox

**FIGURE 11E:** región de ADN-T de pTobRD2-QPTox

**FIGURE 11F:** región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox

**FIGURA 11G:** región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox

**FIGURA 12:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

**FIGURA 13:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-

14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

**FIGURA 14:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

**FIGURA 15:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

**FIGURA 16:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS

**FIGURA 17:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

**FIGURA 18A:** región de ADN-T de pGWB2

**FIGURA 18B:** región de ADN-T de p35S-NBB1

**FIGURA 18C:** región de ADN-T de p35S-NBB1

**FIGURA 19:** análisis de inmunotransferencia de líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT

**FIGURA 20:** plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT

**FIGURA 21A:** confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en bácmidos recombinantes

**FIGURA 21B:** detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos y eluatos de columnas de Ni-NTA

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

**[00023]** La presente invención se refiere al aumento de los alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*. La divulgación también se refiere a la producción de alcaloides nicotínicos en células que de otro modo no los producirían. Según se describe a continuación, los presentes inventores se dieron cuenta de que podía influirse en cuatro genes, A622, NBB1, QPT y PMT, para conseguir un aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*. Es decir, la sobreexpresión de cualquiera de estos cuatro genes aumenta los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Es posible obtener mayores aumentos de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión simultánea de al menos dos de los cuatro genes, tales como QPT y PMT.

**[00024]** A622 y NBB1 pueden introducirse en plantas o células no productoras de nicotina para conseguir así que produzcan nicotina o compuestos relacionados.

**[00025]** Además de proporcionar una metodología para aumentar los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*, la invención proporciona también el aumento simultáneo de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*. Conforme a este aspecto, el aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento puede conseguirse mediante una combinación de técnicas de ingeniería genética y mejora convencional.

**[00026]** Todos los términos técnicos empleados en esta memoria descriptiva son de uso común en bioquímica, biología molecular y agricultura: por consiguiente, son entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Estos términos técnicos pueden encontrarse, por ejemplo, en: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª edición, vols. 1-3, ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Ausubel y col., Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 5ª ed., vols. 1-2, ed. Ausubel y col., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, vols. 1-2, ed. Green y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1997; PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999 (denominado comúnmente como "informe del IOM").

**[00027]** La metodología que incluye técnicas de biología de plantas se describe en este documento y también se describe en detalle en tratados como METHODS IN PLANT MOLEULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL, ed. Maliga y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1995. Diversas técnicas que usan PCR se describen, por ejemplo en Innis y col., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2003. Los pares de cebadores para PCR pueden derivarse de secuencias conocidas por técnicas conocidas, como el uso de programas de

ordenador destinados a este fin, por ejemplo, Primer, versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, EE. UU. Los procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-62 (1981) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981).

5

[00028] Las digestiones con enzimas de restricción, fosforilaciones, ligaciones y transformaciones se llevaron a cabo según se describe en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Todos los reactivos y materiales usados para el cultivo y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis. EE. UU.), DIFCO Laboratories (Detroit, Mich. EE. UU.), Invitrogen (Gaithersburg, Md., EE. UU.) o Sigma Chemical Company (San Luis, Mo. EE. UU.), a menos que se especifique de otro modo.

10

[00029] Los términos "codificante" y "codifica" se refieren al proceso por el que un gen, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, proporciona información a una célula, a partir de la cual puede ensamblarse una serie de aminoácidos en una secuencia aminoacídica específica para producir una enzima activa. A causa de la degeneración del código genético, algunos cambios de bases en la secuencia de ADN no cambian la secuencia aminoacídica de una proteína. Por lo tanto, se entiende que se contemplan modificaciones en las secuencias de ADN que codifican A622 y NBB1, respectivamente, que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales de cada una de las enzimas.

20

#### **I. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1.**

[00030] Aunque A622 y NBB1 se habían identificado previamente, antes de la presente divulgación, el campo desconocía totalmente que la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1 en una planta de *Nicotiana* aumentara el contenido de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, la presente divulgación abarca tanto la metodología como las construcciones para el aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 y NBB1. La sobreexpresión de los dos genes, A622 y NBB1, según la presente invención, aumenta aún más los niveles de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*.

30

[00031] En la presente descripción, un "alcaloide" es un compuesto básico con nitrógeno que se encuentra en plantas y es producido por el metabolismo secundario. Un "alcaloide nicotínico" es nicotina o un alcaloide relacionado estructuralmente con la nicotina. En el caso del tabaco, el contenido de alcaloides nicotínicos y el contenido de alcaloides totales se usan como sinónimos.

35

[00032] Algunos alcaloides nicotínicos principales de *Nicotiana* ilustrativos incluyen, pero no se limitan a nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina. Algunos alcaloides secundarios ilustrativos de *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a anatabina, N-metilanatabina, N-metilanabasina, miosmina, anabaseína, N'-formilnornicotina, nicotirina y cotinina. Otros alcaloides secundarios en tabaco se describen, por ejemplo en Hecht, S. S. y col., Accounts of Chemical Research 12: 92-98 (1979); Tso, T. C., PRODUCTION, PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF TOBACCO PLANT, Ideals Inc. (Beltsville, MD), 1990.

40

[00033] Muchas otras bases de piridilo además de numerosos derivados de nornicotina, anatabina y anabasina son alcaloides nicotínicos de los que se ha descrito que están presentes en tabaco y para los fines de la presente divulgación deberán incluirse dentro de los alcaloides secundarios en *Nicotiana*. La mayoría de estos, así denominados, alcaloides nicotínicos secundarios están presentes en cantidades inferiores a 50 µg/g (con respecto a peso seco) y muchos otros están presentes en cantidades de nanogramos. Bush, L. P., y col., "Biosynthesis and metabolism in nicotine and related alkaloids" en NICOTINE AND RELATED ALKALOIDS, J. W. Gorrod y J. Wahren (eds.), Chapman y Hall, London (1993); Bush, L. P., y col., "Alkaloid Biosynthesis" en TOBACCO PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999. Las estructuras químicas de varios alcaloides nicotínicos se presentan, por ejemplo, en Felpin y col., J. Org. Chem. 66: 6305-312 (2001).

50

[00034] La nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum*, así como en del 50 al 60 % de las otras especies de *Nicotiana*. Dependiendo de la variedad, de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 95 % de los alcaloides totales de *N. tabacum* es nicotina. Bush y col. (1999), referencia anterior; Hoffmann a col., Journal of Toxicology and Environmental Health 41: 1-52 (1994). Sobre la base de la acumulación de alcaloides en las hojas, nornicotina, anatabina y anabasina son los otros alcaloides principales en *N. tabacum*. Anatabina no es normalmente el alcaloide principal en ninguna especie de *Nicotiana*, pero se acumula en relativamente grandes cantidades en tres especies; anabasina es el alcaloide principal en cuatro especies. Nornicotina es el alcaloide principal en del 30 al 40 % de las especies de *Nicotiana*.

60

[00035] En esta descripción, "expresión" indica la producción del producto proteínico codificado por una secuencia nucleotídica. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto proteínico en un organismo transgénico que supera los niveles de producción en un organismo normal y no manipulado por ingeniería genética. Como es convencional en la técnica, las secuencias nucleotídicas se indican en letra cursiva (por ejemplo, *PTM*),

65

mientras que las secuencias polipeptídicas no se escriben en letra cursiva (por ejemplo, PMT).

#### •A622

- 5 **[00036]** Se ha descrito que A622 muestra el mismo patrón de expresión que PMT. Shoji y col., Plant Cell Physiol. 41: 1072-76 (2000a) y Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002). Ambos A622 y PMT se expresan específicamente en raíces, especialmente en el córtex y la endodermis de las partes apicales de las raíces y los pelos radicales. Además, A622 y PMT tienen un patrón de expresión común en respuesta a la regulación por NIC y la estimulación por metiljasmonato. A622 se induce en las raíces de *Nicotiana tabacum* en respuesta a lesiones de los tejidos  
10 aéreos Cane y col., Func. Plant Biol. 32: 305-20 (2005). En *N. glauca*, A622 se induce en hojas lesionadas en condiciones que resultan en la inducción de QPT. Sinclair y col., Func. Plant Biol. 31: 721-29 (2004).

- [00037]** Los locus *NIC1* y *NIC2* son dos locus genéticos independientes en *N. tabacum*, anteriormente designados como A y B. Las mutaciones *nic1* y *nic2* reducen los niveles de expresión de las enzimas de la biosíntesis de nicotina y el contenido de nicotina; generalmente el contenido de nicotina del tipo natural > el de plantas homocigotas para *nic2* > el de plantas homocigotas para *nic1* > el de plantas homocigotas para *nic1* y *nic2*. Legg y Collins Can. J. Cyto. 13: 287 (1971); Hibi y col., Plant Cell 6: 723-35 (1994); Reed y Jelesko, Plant Science 167: 1123 (2004). En esta descripción, "*nic1nic2*" indica genotipos de tabaco homocigotos para las dos mutaciones *nic1* y *nic2*.  
20

- [00038]** La secuencia de ácido nucleico de A622 (SEQ ID NO: 3) ha sido determinada. Hibi y col. (1994), referencia anterior. La proteína A622 (SEQ ID NO: 4) codificada por esta secuencia de ácido nucleico es similar a las isoflavona-reductasas (IFR) y contiene un motivo de unión a NADPH. A622 muestra homología con TP7, una reductasa de éter bencílico de fenilcumarano de tabaco (PCBER), implicada en la biosíntesis de lignina. Shoji y col.  
25 (2002), referencia anterior. Sin embargo, no se observó actividad de PCBER al ensayar la proteína A622 expresada en *E. coli* con dos sustratos diferentes.

- [00039]** Sobre la base de la coregulación de A622 y PMT y la similitud de A622 a las IFR, se propuso para A622 una función como reductasa en las etapas finales de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Hibi y col. (1994);  
30 Shoji y col. (2000a). Sin embargo, no se observó ninguna actividad de IFR al expresar la proteína en bacterias (mismas referencias). Por lo tanto, de aquí no se dedujo que la sobreexpresión de A622 aumentara los niveles de nicotina.

- [00040]** La "expresión de A622" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 3.  
35 La "sobreexpresión de A622" indica un aumento de la expresión de A622. La sobreexpresión de A622 ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de A622 incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de A622 desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 3), SEQ ID NO: 3B y todas las variantes polinucleotídicas de A622.  
40

#### •NBB1

- [00041]** La secuencia de *NBB1* se identificó como un ADNc preparado a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, conforme al protocolo de Katoh y col., Proc. Japan Acad. 79 (Serie B): 151-54  
45 (2003). Al igual que A622, *NBB1* está controlado los locus reguladores de la biosíntesis de nicotina, *NIC1* y *NIC2*. *NBB1* y PMT tienen el mismo patrón de expresión en las plantas de tabaco. La participación de *NBB1* en la biosíntesis de nicotina está indicada por el hecho de que *NBB1*, al igual que PMT y A622, está bajo el control de los genes *NIC* y muestra un patrón de expresión similar.

- 50 **[00042]** La secuencia de ácido nucleico de *NBB1* (SEQ ID NO: 1) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 2. La "expresión de *NBB1*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 1. La "sobreexpresión de *NBB1*" indica un aumento de la expresión de *NBB1*. La sobreexpresión de *NBB1* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *NBB1* incluye la biosíntesis de un producto génico  
55 codificado por los siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1B y todas las variantes polinucleotídicas de *NBB1*.

## II. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de PMT

- [00043]** El único informe anterior que demuestra la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de nicotina en  
60 una especie de *Nicotiana* fue en *N. sylvestris*, en la que la sobreexpresión de PMT resultó en un aumento moderado del 40 % de la nicotina en la hoja. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001). Mientras que la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en una especie vegetal como *N. sylvestris*, resulta en un aumento de la acumulación de metabolitos secundarios, esto no quiere decir necesariamente que se vaya a producir una acumulación similar de metabolitos secundarios en una especie relacionada como *N. tabacum*.  
65 Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Esto es especialmente relevante para la sobreexpresión de PMT, dado que *N. tabacum* contiene cinco genes PMT expresados y *N. sylvestris* contiene tres genes PMT expresados.

Hashimoto y col., Plant Mol. Biol. 37: 25-37 (1998); Reichers y Timko, Plant Mol. Biol. 41: 387-401 (1999). De hecho, cuando el gen *PTM* de *N. tabacum* se expresó en exceso en cultivos de raíces capilares de *Duboisia*, los niveles de nicotina, hiosciamina y escopolamina no aumentaron significativamente. Moyano y col., Phytochemistry 59, 697-702 (2002). Igualmente, la sobreexpresión del mismo gen *PTM* en plantas y cultivos de raíces capilares transgénicos de *Atropa belladonna* no afectó a los niveles de hiosciamina y escopolamina. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001); Rothe y col., J. Exp. Bot. 54: 2065-070 (2003).

**[00044]** En especies solanáceas, como el tabaco, parece ser que la misma ruta de biosíntesis de alcaloides en dos especies de plantas relacionadas puede regularse de manera diferente y la sobreexpresión de un gen dado no conduce necesariamente a un patrón similar de acumulación de metabolitos secundarios. Moyano y col., J. Exp. Bot. 54: 203-11 (2003). Por ejemplo, en el análisis de sesenta especies de *Nicotiana* se observó una variación considerable en el contenido de alcaloides totales y en el perfil de alcaloides entre las especies. Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Por ejemplo, mientras que *N. sylvestris* mostró el mayor contenido en peso seco de alcaloides totales (la suma de nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina), con 29.600 µg/g o el 2,96 %, *N. alata* mostró el menor contenido, con 20 µg/g o el 0,002 %. La proporción de nicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue de aproximadamente el 80 %, en comparación con aproximadamente el 95 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Además, la proporción de nornicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue del 19,1 % en comparación con el 3 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Sobre la base de estas amplias variaciones entre las sesenta especies de *Nicotiana*, Saitoh y col. concluyen que la cantidad y la proporción de alcaloides totales e individuales presentes en una planta depende de la especie y que no parece existir una correlación clara entre el patrón de alcaloides y la clasificación del género *Nicotiana* (página 477 en la misma referencia).

**[00045]** Por consiguiente, la presente divulgación describe metodología y construcciones para aumentar los alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de *PMT*.

**[00046]** La secuencia de ácido nucleico de *PTM* (SEQ ID NO: 7) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 8. La "expresión de *PTM*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 7. La "sobreexpresión de *PTM*" indica un aumento de la expresión de *PTM*. La sobreexpresión de *PTM* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *PTM* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *PTM* desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 7B y todas las variantes polinucleotídicas de *PTM*.

### 35 III. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PMT*

**[00047]** Hasta ahora no se sabía que la sobreexpresión de *QPT* y *PTM* aumentara sinérgicamente los alcaloides nicotínicos. Es decir, que fuera posible alcanzar mayores aumentos de los niveles de nicotina mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PTM*, en comparación con la sobreexpresión de solo *QPT* o *PTM*. Conforme a este aspecto de la divulgación, se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende ambos *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*.

**[00048]** La secuencia de ácido nucleico de *QPT* (SEQ ID NO: 5) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 6. La "expresión de *QPT*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 5. La "sobreexpresión de *QPT*" indica un aumento de la expresión de *QPT*. La sobreexpresión de *QPT* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *QPT* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *QPT* según se desvela en la patente de los EE. UU. n° 6.423.520 (SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 5B y todas las variantes polinucleotídicas de *QPT*.

### 50 IV. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT*

**[00049]** Aunque es bien sabido que *QPT* desempeña un papel en la biosíntesis de nicotina, véase el documento WO 98/56923, la presente divulgación contempla mayores aumentos de la síntesis de nicotina mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en *Nicotiana*. Conforme a este aspecto de la divulgación se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende al menos dos de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*. Una construcción de ácido nucleico ilustrativa de la presente invención puede comprender *QPT* y *A622*.

### 60 V. Aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*

**[00050]** Las plantas con aumento de nicotina de la invención pueden producirse por mejora convencional o cruzamientos, según se describen por Wemsman y col., en 2 PRINCIPLES OF CULTIVAR DEVELOPMENT: CROP SPECIES (Macmillan 1997). Por ejemplo, se emplea un transformante manipulado por ingeniería genética, regenerado a partir de material de tabaco que contiene el transgén adecuado, para introducir por introgresión un



carácter de alto nivel de nicotina en un fondo genético comercialmente aceptable y deseable, con lo que se obtiene un cultivar o variedad de tabaco que combina un alto nivel de nicotina con dicho fondo genético deseable.

**[00051]** De manera similar, por ejemplo, puede producirse una planta manipulada por ingeniería genética que exprese en exceso *QPT* y *A622* mediante el cruzamiento de una planta transgénica que expresa en exceso *QPT* con una planta transgénica que expresa en exceso *A622*. Después de varios ciclos sucesivos de cruzamiento y selección, puede seleccionarse una planta manipulada por ingeniería genética que expresa en exceso *QPT* y *A622*.

**[00052]** Mientras que cualquier gen deseable puede introducirse por introgresión en una variedad de alto nivel de nicotina, existe la necesidad crítica de introducir un carácter de alto nivel de nicotina en el fondo genético de un tabaco de alto rendimiento. Varios estudios indican que las mejoras del rendimiento han sido dificultadas por la correlación negativa que existe con la concentración de nicotina. PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, en la página 46 (1999). En sus reflexiones sobre la mejora del tabaco, el Dr. Earl Wernsman afirma que la selección continuada en busca solamente de rendimiento resultará pronto en una población con una concentración de nicotina en la hoja curada tan baja que dichos tabacos serán inaceptables para la industria. Wernsman, Recent Advances in Tobacco, Science 25: 5-35 (1999). Wernsman postula que pueden necesitarse procedimientos genéticos de regulación por aumento de la síntesis de nicotina para permitir aumentos adicionales de la capacidad de rendimiento, mientras se mantiene la concentración de nicotina (misma referencia).

**[00053]** Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un modo de corregir la "correlación negativa" entre el rendimiento y el contenido de nicotina en plantas de *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina en una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento. Las enzimas de la biosíntesis de nicotina de ejemplo incluyen, pero no se limitan a *QPTasa*, *PMTasa*, *A622*, *NBB1*, arginina-descarboxilasa (*ADC*), metilputrescina-oxidasa (*MPO*), *NADH*-deshidrogenasa, ornitina-descarboxilasa (*ODC*) y *S*-adenosilmetionina-sintetasa (*SAMS*). Las plantas con aumento de nicotina que resultan de aquí se cruzan después con cualquier fondo genético comercialmente aceptable y deseable que mantenga un alto rendimiento. Las plantas de *Nicotiana* de alto rendimiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a los cultivares de *Nicotiana tabacum* K326, NC71, NC72 y RG81. Después de ciclos sucesivos de cruzamiento y selección se produce consiguientemente una planta manipulada por ingeniería genética con aumento de nicotina y del rendimiento.

**[00054]** Un aspecto adicional de la divulgación proporciona el cruzamiento de una planta con aumento de nicotina con una planta con aumento del rendimiento puede usarse como otra estrategia para romper la correlación negativa entre el contenido de nicotina y el rendimiento.

**[00055]** Los "genes de aumento del rendimiento" abarcan cualquier gen cuya expresión se correlaciona con un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de  $\text{CO}_2$ , más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

**[00056]** Igualmente, una "planta con aumento del rendimiento" se refiere a una planta o cualquier porción de la misma que expresa en exceso un "gen de aumento del rendimiento" y muestra un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de  $\text{CO}_2$ , más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

**[00057]** Por ejemplo, y sin limitar la invención de ningún modo, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen relacionado con la patogénesis (*PR*). Se ha demostrado que la sobreexpresión de un gen *PRms* de maíz en tabaco produce plantas transgénicas de tabaco con más biomasa y mayor producción de semillas. Murillo y col., Plant J. 36: 330-41 (2003). Igualmente, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen codificante de una enzima del ciclo de Calvin. Tamoi y col. Plant Cell Physiol. 47(3): 380-390 (2006). Por ejemplo, las plantas de tabaco que expresaban en exceso una fructosa-1,6-sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa de cianobacterias mostraron mayor eficiencia fotosintética y eficiencia de crecimiento en comparación con el tabaco natural. Miyagawa y col., Nature Biotech. 19: 965-69 (2001).

**[00058]** La presente divulgación también contempla la producción de una planta con aumento del rendimiento y aumento de nicotina mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina, como *QPT*, *PMT*, *A622* o *NBB1*, y la sobreexpresión de un gen de aumento del rendimiento, como *PRms*, fructosa-1,6-sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa en la misma planta o célula.

## VI. Producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

[00059] A622 y NBB1 pueden introducirse en una planta o célula no productora de nicotina, con lo que se producirá nicotina o compuestos relacionados en un organismo o célula que de otro modo no produce estos compuestos. A partir de estos organismos o células manipulados pueden producirse diversos productos, incluida nicotina, análogos de nicotina y enzimas de la biosíntesis de la nicotina.

[00060] Una "planta no productora de nicotina" se refiere a cualquier planta que no produce nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas plantas no productoras de nicotina ilustrativas incluyen, pero no se limitan a *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*.

[00061] Las "células no productoras de nicotina" se refieren a células de cualquier organismo que no producen nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias.

[00062] Un "análogo de nicotina" tiene la estructura básica de la nicotina, pero puede tener, por ejemplo, diferentes sustituyentes en el anillo. Por ejemplo, un análogo de la nicotina puede sustituir un hidrógeno (-H) por el grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), con lo que se produce nornicotina, que es un análogo de la nicotina. Además de tener en común una estructura similar con la nicotina, los análogos de nicotina pueden producir efectos fisiológicos similares. Por ejemplo, la cotinina se ha citado por sus efectos positivos en la mejora de la concentración y la memoria y, consiguientemente, es un análogo de la nicotina. Por consiguiente, los análogos de la nicotina se definen ampliamente para cubrir todos y cada uno de los compuestos que tienen una estructura y actividad funcional similar a la de la nicotina.

## VII. Síntesis de compuestos mediante el uso de nuevas enzimas

[00063] Recientemente, ha habido gran interés en la síntesis de análogos que reconozcan específicamente los receptores de la nicotina y proporcionen efectos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas y discapacidades cognitivas. Por ejemplo, Targacept, una empresa farmacéutica formada como extensión de R. J. Reynolds Tobacco Company, se esfuerza en desarrollar y comercializar fármacos análogos de la nicotina, basados en la activación selectiva de receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina (NNR). Dado que la presente divulgación proporciona una nueva enzima de la biosíntesis de nicotina, puede ser valioso el uso de NBB1 solo, o NBB1 y A622 para el desarrollo de nuevos análogos de nicotina. Por ejemplo, mediante el uso de los procedimientos y construcciones de la presente invención, puede producirse un análogo de un alcaloide nicotínico al proporcionar un precursor análogo de la nicotina a un sistema de cultivo celular.

[00064] Adicionalmente, las enzimas de la presente invención pueden usarse para la síntesis *in vitro* de nicotina y compuestos relacionados. Es decir, pueden usarse A622 y NBB1 recombinantes para la síntesis o la síntesis parcial de un alcaloide nicotínico y un análogo de un alcaloide nicotínico.

### Secuencias de biosíntesis de alcaloides nicotínicos

[00065] Se han identificado genes de biosíntesis de alcaloides nicotínicos en varias especies de plantas, como por ejemplo, plantas de *Nicotiana*. Por consiguiente, la presente descripción abarca cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc aislada de una especie de plantas o producida sintéticamente que aumente la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Adicionalmente, la expresión de tal secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos produce alcaloides nicotínicos en una célula no productora de nicotina, como una célula de un insecto. El ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también denominada hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada hebra antisentido.

[00066] Se entiende que NBB1, A622, QPT y PMT incluyen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, así como moléculas de ácido nucleico compuestas por variantes de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas, en que las variantes codifican un polipéptido con actividad de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, las secuencias con "secuencias de bases con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas" retienen la actividad fisiológica incluso cuando la secuencia aminoácídica codificada tiene uno o más aminoácidos sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos. Adicionalmente, pueden existir múltiples formas de A622, NBB1, QTPasa y PTMasa, que pueden deberse a la modificación postraducciona de un producto génico o a múltiples formas de los genes PMT, QPT, A622 o NBB1 respectivos. Las secuencias nucleotídicas que tienen tales modificaciones y que codifican una enzima de biosíntesis de alcaloides nicotínicos están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

[00067] Por ejemplo, pueden suprimirse las regiones no traducidas de la cola de poli A o los extremos 5' o 3' y pueden suprimirse bases hasta llegar a la supresión de aminoácidos. También es posible sustituir bases, siempre

que no se produzcan cambios en el marco de lectura. Asimismo pueden “añadirse” bases hasta llegar a añadir aminoácidos. Sin embargo, es esencial que ninguna de tales modificaciones resulte en la pérdida de la actividad enzimática de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Un ADN modificado en este contexto puede obtenerse por modificación de las secuencias de bases del ADN de la invención, de modo que se sustituyan, supriman, inserten o añadan aminoácidos en sitios específicos, por ejemplo, por mutación específica. Zoller y Smith, Nucleic Acid Res. 10: 6487-500 (1982).

**[00068]** Una secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos puede sintetizarse desde el principio a partir de las bases apropiadas, por ejemplo, mediante el uso de una secuencia proteínica apropiada desvelada en este documento como guía para crear una molécula de ADN que, aunque diferente de la secuencia nativa de ADN, resulta en la producción de una proteína con la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia similar. Este tipo de molécula sintética de ADN es útil a la hora de introducir en una célula no vegetal una secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga que refleja frecuencias de uso de codones diferentes (distintas de las de plantas) y que si se usa sin modificar puede resultar en una traducción ineficiente por la célula huésped.

**[00069]** Con molécula(s) de ácido nucleico “aislada(s)” se indica una molécula o moléculas de ácido nucleico, ADN o ARN, extraída(s) de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en una construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas de ADN que están purificadas, parcial o sustancialmente, en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN, producidos *in vitro*, de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además aquellas moléculas producidas sintéticamente.

**[00070]** Un “ácido nucleico exógeno” se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia) mediante una actividad humana. Tal ácido nucleico exógeno puede ser una copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos de la misma.

**[00071]** Por el contrario, un “ácido nucleico endógeno” se refiere a un ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc que está presente en el genoma de una planta u organismo que va a manipularse por ingeniería genética. Una secuencia endógena es “nativa”, es decir, autóctona de la planta u organismo que va a manipularse por ingeniería genética.

**[00072]** Un “ácido nucleico heterólogo” se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia), que no es una copia de una secuencia que se encuentre de forma natural en la célula en la que se introduce. Tal ácido nucleico heterólogo puede comprender segmentos que son copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos de la misma.

**[00073]** Un “ácido nucleico quimérico” comprende una secuencia codificante o un fragmento de la misma unido a una región de iniciación de la transcripción que es diferente de la región de iniciación de la transcripción con la que está asociada en las células en las que la secuencia se encuentra de forma natural.

**[00074]** A menos que se indique de otro modo, todas las secuencias nucleotídicas determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en este documento se determinaron mediante un secuenciador automático de ADN, como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc. Por lo tanto, como es sabido en la técnica para toda secuencia determinada mediante esta estrategia automática, cualquier secuencia nucleotídica determinada en este documento puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas de manera automática son típicamente idénticas en al menos aproximadamente el 95 %, más típicamente, idénticas en al menos de aproximadamente el 96 % a al menos aproximadamente el 99,9 % a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de manera más precisa por otras estrategias, incluidos los procedimientos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se sabe en la técnica, una única inserción o delección en una determinada secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia real causará un cambio del marco de lectura en la traducción de dicha secuencia nucleotídica, de modo que la secuencia aminoacídica prevista codificada por una secuencia nucleotídica determinada puede ser completamente diferente de la secuencia aminoacídica codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, a partir del punto de tal inserción o delección.

**[00075]** Para los fines de la invención, dos secuencias hibridan cuando forman un complejo bicatenario en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo inespecífico. Véase Ausubel y col, referencia anterior, en la sección 2.9, suplemento 27 (1994). Las secuencias pueden hibridar en condiciones de “astringencia moderada”, que se definen como una temperatura de 60 °C en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo inespecífico. Para una hibridación de “alta astringencia”, la temperatura se eleva a 68 °C. Después de la reacción de hibridación de astringencia moderada, los nucleótidos se lavan en una disolución de 2x SSC más SDS al 0,05 %

cinco veces a temperatura ambiente, con lavados subsiguientes con 0,1x SSC más SDS al 0,1 % a 60 °C durante 1 h. Para una alta astringencia, la temperatura de lavado se aumenta a 68 °C. Para los fines de la invención, los nucleótidos hibridados son aquellos que se detectan al usar 1 ng de una sonda radiomarcada con una radiactividad específica de 10.000 cuentas por minuto/ng, en que los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de la exposición a una película de rayos X a -70 °C durante no más de 72 horas.

**[00076]** La presente divulgación se dirige a aquellas moléculas de ácido nucleico que son idénticas en al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Se prefieren moléculas de ácido nucleico idénticas en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Las diferencias entre dos secuencias de ácido nucleico pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos dentro de la secuencia de referencia.

**[00077]** En la práctica, que una molécula de ácido nucleico concreta sea idéntica en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % a una secuencia nucleotídica de referencia se refiere a una comparación establecida entre dos moléculas llevada a cabo con el uso de algoritmos estándar bien conocidos en la técnica y puede determinarse convencionalmente mediante programas de ordenador disponibles al público como el algoritmo BLASTN. Véase Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-402 (1997).

**[00078]** La presente divulgación proporciona además moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, la cual codifica un enzima activa de la biosíntesis de nicotina, en que la enzima tiene la secuencia aminoacídica que corresponde a SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, respectivamente, y en que la proteína de la divulgación comprende sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos que no alteran la funcionalidad de la enzima de la biosíntesis de nicotina.

**[00079]** Una "variante" es una secuencia nucleotídica o aminoacídica que se desvía de la secuencia nucleotídica o aminoacídica estándar o dada de un gen o proteína en concreto. Los términos "isoforma", "isotipo" y "análogo" también se refieren a formas "variantes" de una secuencia nucleotídica o aminoacídica. Una secuencia aminoacídica alterada por la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos o un cambio de la secuencia nucleotídica puede considerarse una secuencia "variante". La variante puede tener cambios "conservadores", en que el aminoácido sustitutivo tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. Una variante puede tener cambios "no conservadores", por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Otras variaciones análogas secundarias pueden incluir también deleciones o inserciones de aminoácidos o ambas. Es posible obtener una orientación para determinar qué restos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse o suprimirse mediante programas de ordenador bien conocidos en la técnica como Vector NTI Suite (InforMax, MD, EE. UU.). Una "variante" también puede referirse a un "gen reordenado", como los descritos en las patentes asignadas a Maxygen.

#### **Construcciones de ácidos nucleicos**

**[00080]** Según un aspecto de la divulgación, una secuencia que aumenta la biosíntesis de alcaloides nicotínicos se incorpora a una construcción de ácido nucleico que es adecuada para la transformación de plantas o células. De este modo, una construcción de ácido nucleico tal puede usarse para la sobreexpresión de al menos uno de A622, NBB1, PMT y QPT en una planta, así como para la expresión de A622 y NBB1, por ejemplo, en una célula no productora de nicotina.

**[00081]** Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes pueden llevarse a cabo mediante técnicas estándar. Por ejemplo, la secuencia de ADN para transcripción puede obtenerse tratando un vector que contiene dicha secuencia con enzimas de restricción para escindir el segmento adecuado. La secuencia de ADN para transcripción puede generarse también por hibridación y ligación de oligonucleótidos sintéticos o mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener sitios de restricción adecuados en cada extremo. La secuencia de ADN se clona después en un vector que contiene elementos de regulación adecuados, como un promotor en la región 5' y secuencias de terminación en la región 3'.

**[00082]** Un aspecto importante de la presente invención es el uso de construcciones de ácidos nucleicos en las que una secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides nicotínicos está unida operativamente a una o más secuencias de regulación que controlan la expresión de la secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en ciertos tipos de células, órganos o tejidos sin afectar excesivamente al desarrollo o fisiología normales.

**[00083]** El "promotor" designa una región de ADN en la región 5' con respecto al inicio de la transcripción que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor constitutivo" es un promotor que es activo durante toda la vida de la planta y en la mayoría de las condiciones ambientales. Los promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles constituyen la clase de "promotores no constitutivos". "Unido operativamente" se refiere a una

conexión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en que la secuencia promotora inicia e interviene en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas.

- 5 **[00084]** Los promotores útiles para la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida en una célula para aumentar la expresión de A622, NBB1, PMTasa o QPTasa pueden ser promotores constitutivos, como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles. Los promotores preferidos incluyen promotores que son activos en tejidos radicales, como el promotor RB7 de tabaco (Hsu y col. Pestic. Sci. 44: 9-19 (1995); patente de los EE. UU. n° 5.459.252), el promotor CRWAQ81 de maíz (solicitud de patente publicada de los EE. UU. 20050097633); el  
10 promotor ARSK1 de *Arabidopsis* (Hwang y Goodman, Plant J. 8: 37-43 (1995)), el promotor MR7 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.837.848), el promotor ZRP2 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.633.363), el promotor MTL de maíz (patentes de los EE. UU. n° 5.466.785 y n° 6.018.099), los promotores MRS1, MRS2, MRS3 y MRS4 de maíz (solicitud de patente de los EE. UU. 20050010974), un promotor críptico de *Arabidopsis* (solicitud de patente de los  
15 EE. UU. 20030106105) y promotores que se activan en condiciones que resultan en la elevada expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotina como el promotor RD2 de tabaco (patente de los EE. UU. n° 5.837.876), los promotores de PMT (Shoji T. y col., Plant Cell Physiol. 41: 831-39 (2000b); documento WO 2002/038588) o un promotor de A622 (Shoji T. y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002)).
- 20 **[00085]** Los vectores de utilización en la presente invención pueden contener también secuencias de terminación, que se sitúan en la región 3' de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, para terminar dicha transcripción de ARNm y añadir secuencias de poli A. Algunos ejemplos de tales terminadores son el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina-sintasa (Tnos). El vector de expresión puede contener también potenciadores, codones de inicio, secuencias señal de corte y empalme  
25 y secuencias localizadoras.

- [00086]** Los vectores de expresión de utilización en la presente invención pueden contener también un marcador de selección, mediante el que pueden identificarse las células transformadas en cultivo. El marcador puede estar asociado con la molécula de ácido nucleico heteróloga, es decir, el gen unido operativamente a un  
30 promotor. Según se usa en este documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un carácter o un fenotipo que permite la selección o la identificación de plantas o células que contienen el marcador. En plantas, por ejemplo, el gen marcador codificará la resistencia a un antibiótico o un herbicida. Esto permite la selección de las células transformadas de entre las células que no están transformadas o transfectadas.
- 35 **[00087]** Algunos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen adenosina-desaminasa, dihidrofolato-reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina-cinasa, xantina-guanina-fosforribosiltransferasa, resistencia a glifosato y glufosinato y aminoglucósido-3'-O-fosfotransferasa (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Estos marcadores pueden incluir la resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina y gentamicina. La construcción puede contener también el gen marcador seleccionable *Bar*, que confiere resistencia a análogos del  
40 herbicida fosfinotricina, como glufosinato de amonio. Thompson y col., EMBO J. 9: 2519-23 (1987). También se conocen otros marcadores de selección adecuados.

- [00088]** Pueden usarse marcadores visibles como la proteína verde fluorescente (GFP). También se han descrito procedimientos para la identificación o selección de plantas transformadas basados en el control de la  
45 división celular. Véanse los documentos WO 2000/052168 y WO 2001/059086.

- [00089]** También pueden incluirse secuencias de replicación de origen bacteriano o vírico para permitir la clonación del vector en un huésped bacteriano o fágico. Preferentemente se usa un origen de replicación procariótico de amplio espectro de huésped. También puede incluirse un marcador seleccionable para bacterias  
50 para permitir la selección de células bacterianas que contienen la construcción deseada. Los marcadores seleccionables procarióticos adecuados incluyen además resistencia a antibióticos como kanamicina o tetraciclina.

- [00090]** También puede haber presentes en el vector otras secuencias de ácido nucleico codificantes de funciones adicionales, según se conocen en la técnica. Por ejemplo, si el huésped es *Agrobacterium*, pueden  
55 incluirse secuencias de ADN-T para facilitar la transferencia posterior y la incorporación en los cromosomas de la planta.

### **Plantas para ingeniería genética**

- 60 **[00091]** La presente invención comprende la manipulación genética de una planta de *Nicotiana* para aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos por medio de la introducción de una secuencia polinucleotídica que codifica una enzima de la ruta de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Adicionalmente, la descripción proporciona procedimientos para la producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en plantas no productoras de nicotina, como *Arabidopsis thaliana* y *Atropa belladonna*.

- 65 **[00092]** La "manipulación por ingeniería genética" (GE) abarca cualquier metodología para la introducción de

un ácido nucleico o una mutación específica en un organismo huésped. Por ejemplo, una planta de tabaco está manipulada por ingeniería genética cuando está transformada con una secuencia polinucleotídica que aumenta la expresión de un gen, como *A622* o *NBB1*, con lo que aumentan los niveles de nicotina. Por el contrario, una planta de tabaco que no está transformada con una secuencia polinucleotídica es una planta de control y se denomina planta “sin transformar”.

**[00093]** En el presente contexto, la categoría “manipuladas por ingeniería genética” incluye plantas y células “transgénicas” (véase la definición en la referencia a continuación), así como plantas y células producidas por medio de mutagénesis dirigida, efectuada, por ejemplo, a través del uso de oligonucleótidos quiméricos ARN/ADN, según se describe en Beetham y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96: 8774-8778 (1999) y Zhu y col., en la referencia citada, páginas 8768-8773, o las denominadas “oligonucleobases recombinogénicas”, según se describen en la solicitud PCT WO 03/013226. Igualmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede producirse mediante la introducción de un virus modificado que, a su vez, causa una modificación genética en el huésped que resulta similar a las producidas en una planta transgénica, según se describe en este documento. Véase la patente de los EE. UU. n° 4.407.956. Adicionalmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede ser el producto de cualquier estrategia nativa (es decir, que no implica secuencias nucleotídicas exógenas), implementada por la introducción solamente de secuencias de ácido nucleico derivadas de la especie huésped o de una especie sexualmente compatible. Véase, por ejemplo, la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0107455.

**[00094]** “Planta” es un término que abarca plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales diferenciadas o indiferenciadas y la descendencia de las mismas. El material vegetal incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que pueden usarse en la presente invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores en la que es posible aplicar técnicas de ingeniería genética, incluidas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como gimnospermas. Las plantas productoras de nicotina preferidas incluyen los géneros *Nicotiana*, *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas.

**[00095]** “Tabaco” se refiere a cualquier planta en el género *Nicotiana* que produce alcaloides nicotínicos. Tabaco también se refiere a productos que comprenden material producido a partir de una planta de *Nicotiana* e incluye, por lo tanto, tabaco expandido, tabaco reconstituido, cigarrillos, cigarros, tabaco de mascar o formas de tabaco sin humo, rapé y snus preparados a partir de tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética. Algunos ejemplos de la especie *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a los siguientes: *Nicotiana acaulis*, *Nicotiana acuminata*, *Nicotiana acuminata* var. *multiflora*, *Nicotiana africana*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana amplexicaulis*, *Nicotiana arentsii*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana benavidesii*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana bonariensis*, *Nicotiana cavicola*, *Nicotiana clelandii*, *Nicotiana cordifolia*, *Nicotiana corymbosa*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana forgetiana*, *Nicotiana fragrans*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana goodspeedii*, *Nicotiana gossei*, *Nicotiana hybrid*, *Nicotiana ingulba*, *Nicotiana kawakamii*, *Nicotiana knightiana*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana linearis*, *Nicotiana longiflora*, *Nicotiana maritima*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana miersii*, *Nicotiana noctiflora*, *Nicotiana nudicaulis*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*, *Nicotiana otophora*, *Nicotiana paniculata*, *Nicotiana pauciflora*, *Nicotiana petunioides*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana raimondii*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rosulata*, *Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*, *Nicotiana rotundifolia*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana setchellii*, *Nicotiana simulans*, *Nicotiana solanifolia*, *Nicotiana spegazzinii*, *Nicotiana stocktonii*, *Nicotiana suaveolens*, *Nicotiana sylvestris*, *N. tabacum*, *Nicotiana thyrsoiflora*, *Nicotiana tomentosa*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana trigonophylla*, *Nicotiana umbratica*, *Nicotiana undulata*, *Nicotiana velutina*, *Nicotiana wigandioides* y *Nicotiana x sanderae*.

**[00096]** En la presente descripción, las “raíces capilares de tabaco” se refieren a raíces de tabaco que tienen ADN-T de un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* integrado en el genoma y crecen en cultivo sin la adición de auxina u otras fitohormonas. Las raíces capilares de tabaco producen alcaloides nicotínicos al igual que las raíces de una planta de tabaco. Estos tipos de raíces se caracterizan por un crecimiento rápido, ramificación frecuente, plagiotropismo y la capacidad de sintetizar los mismos compuestos que las raíces de la planta intacta. David y col., Biotechnology 2: 73-76 (1984). Las raíces de las plantas solanáceas constituyen el lugar principal de biosíntesis de alcaloides tropánicos y, por lo tanto, los cultivos de raíces capilares son capaces de acumular altos niveles de estos metabolitos. Por ejemplo, véase Oksman-Caldentey & Arroo, "Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures," en METABOLIC ENGINEERING OF PLANT SECONDARY METABOLISM 253-81 (Kluwer Academic Publishers, 2000).

#### **Células no productoras de nicotina para ingeniería genética**

**[00097]** La descripción contempla la manipulación por ingeniería genética de “células no productoras de nicotina” con una secuencia de ácido nucleico codificante de una enzima implicada en la producción de alcaloides nicotínicos. Una célula no productora de nicotina se refiere a una célula de cualquier organismo que no produce nicotina. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna*, *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias. Las células huésped adecuadas se discuten más detalladamente en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:

METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, California (1990).

**[00098]** Una “célula de insecto” se refiere a cualquier célula de un insecto que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células de insectos ilustrativas incluyen las células Sf9 (ATCC CRL 1711).

**[00099]** Una “célula fúngica” se refiere a cualquier célula de un hongo que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células fúngicas ilustrativas incluyen células de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Baldari y col., 1987. EMBO J. 6: 229-234) y *Pichia pastoris* (por ejemplo, *P. pastoris* KM714, disponible de Invitrogen). También pueden usarse células de hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Trichoderma*. Archer y col., Antonie van Leeuwenhoek 65: 245-250 (2004).

**[000100]** Una “célula bacteriana” se refiere a cualquier célula bacteriana que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células bacterianas ilustrativas incluyen *E. coli*, como la cepa de *E. coli* M15/rep4, disponible comercialmente de QIAGEN.

**[000101]** Una “célula de mamífero” se refiere a cualquier célula de un mamífero que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células de mamíferos ilustrativas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS. Las células de mamíferos pueden incluir también un ovocito fertilizado o una célula madre embrionaria no humana en la que se han introducido secuencias codificantes de una enzima de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Tales células huésped pueden usarse después para crear animales transgénicos no humanos. Algunos ejemplos de sistemas para la expresión regulada de proteínas en células de mamíferos incluyen los sistemas de expresión génica Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares. Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992).

**[000102]** Una “célula de alga” se refiere a cualquier especie de alga que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina sin afectar al desarrollo o la fisiología normal del alga. Algunas células de algas ilustrativas incluyen *Chlamydomonas reinhardtii* (Mayfield y Franklin, Vaccine 23: 1828-1832 (2005)).

**[000103]** Dado que la producción de alcaloides nicotínicos en una célula de un insecto podría afectar negativamente al crecimiento y desarrollo del insecto, un sistema de expresión inducible puede mitigar los efectos adversos. Por ejemplo, las células de insecto pueden permitirse crecer primeramente en condiciones no inductoras hasta un estado deseado y entonces se induce la expresión de la enzima.

**[000104]** Adicionalmente, es posible suministrar precursores a las células que expresan los genes de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos para aumentar la disponibilidad de sustrato para la síntesis de dichos alcaloides nicotínicos. También pueden suministrarse a las células análogos de precursores que pueden incorporarse en análogos de alcaloides nicotínicos de origen natural.

#### **Transformación y selección**

**[000105]** Mientras que la nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum* y algunas otras especies del género *Nicotiana*, otras plantas tienen la capacidad de producir nicotina, por ejemplo los géneros *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas. Mediante el uso de las construcciones y procedimientos descritos, puede producirse nicotina en plantas no productoras de nicotina como *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana* y en células, por ejemplo de insectos, hongos y bacterias.

**[000106]** Para los fines de esta descripción, una planta o célula no productora de nicotina, como una célula fúngica, puede transformarse con un plásmido que comprende una o más secuencias, cada una de ellas unida operativamente a un promotor. Por ejemplo, un vector ilustrativo puede comprender una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor. Igualmente, el plásmido puede comprender una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor y una secuencia de *A622* unida operativamente a un promotor. Alternativamente, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con más de un plásmido. Por ejemplo, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con un primer plásmido que comprende una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor, que es distinto de un segundo plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. Por supuesto, el primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la misma célula.

#### *Transformación de plantas*

**[000107]** Una “planta transgénica” se refiere a una planta que comprende una secuencia de ácido nucleico que también está presente de por sí en otro organismo o especie o que se ha optimizado, con respecto al uso de

codones, a partir de otro organismo o especie. Pueden transformarse de diversas maneras conocidas en la técnica las células de plantas angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, o gimnospermas. Por ejemplo, véase Klein y col., *Biotechnology* 4: 583-590 (1993); Bechtold y col., *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199 (1993); Bent y col., *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396 (1986); Paszowski y col., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); Sagi y col., *Plant Cell Rep.* 13: 262-266 (1994). Pueden usarse especies de *Agrobacterium* como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, por ejemplo, de acuerdo con Nagel y col., *Microbiol. Lett.* 67: 325 (1990). Adicionalmente, las plantas pueden transformarse mediante transformación por *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Mesorhizobium*. Broothaerts y col., *Nature* 433: 629-633 (2005).

- 10 **[000108]** Por ejemplo, *Agrobacterium* puede transformarse con un vector de expresión en plantas, por ejemplo, por medio de electroporación, después de lo cual dicho *Agrobacterium* se introduce en las células de la planta, por ejemplo, por medio del procedimiento bien conocido de los discos de hoja. Otros procedimientos adicionales para conseguir esto incluyen, pero no se limitan a electroporación, bombardeo de partículas, precipitación con fosfato de calcio y fusión con polietilenglicol, transferencia a granos de polen en germinación, transformación directa (Lorz y col., *Mol. Genet.* 199: 179-182 (1985)) y otros procedimientos conocidos en la técnica. Si se emplea un marcador de selección, como la resistencia a kanamicina, resulta más fácil determinar qué células se han transformado satisfactoriamente. Los genes marcadores pueden incluirse entre pares de sitios de recombinación reconocidos por recombinasas específicas como cre o flp para facilitar la eliminación del marcador después de la selección. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0143874.

- 20 **[000109]** Pueden producirse plantas transgénicas sin los genes marcadores mediante el uso de un segundo plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica el marcador, distinto de un primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. El primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la misma célula de la planta, de modo que las células de la planta transformadas se identifican por el gen del marcador seleccionable que se expresa transitoriamente y se obtienen plantas transformadas en las que la secuencia de *A622* o *NBB1* está integrada de manera estable en el genoma y el gen marcador no está integrado de forma estable. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2003/0221213. El primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1* puede ser opcionalmente un vector binario con una región de ADN-T constituida en su totalidad por secuencias de ácido nucleico presentes en *N. tabacum* no transgénica natural o una especie de *Nicotiana* sexualmente compatible.

- [000110]** Se sabe que los procedimientos de transformación mediante *Agrobacterium* expuestos anteriormente son útiles para la transformación de dicotiledóneas. Adicionalmente, de la Pena y col., *Nature* 325: 274-276 (1987), Rhodes y col., *Science* 240: 204-207 (1988) y Shimamoto y col., *Nature* 328: 274-276 (1989) han transformado monocotiledóneas cereales mediante *Agrobacterium*. Véase también Bechtold y col., *C.R. Acad. Sci. Paris* 316 (1994), que ilustra la infiltración mediante vacío para la transformación por medio de *Agrobacterium*.

- [000111]** Los procedimientos para la regeneración de una planta transgénica a partir de una célula o cultivo transformado varían de acuerdo con la especie de planta, pero se basan en una metodología conocida. Por ejemplo, los procedimientos para la regeneración de plantas de tabaco transgénico son bien conocidos. Se han seleccionado plantas manipuladas por ingeniería genética con un aumento de la expresión de al menos uno de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. Adicionalmente, las plantas manipuladas por ingeniería genética pueden presentar un aumento de los niveles de nicotina y del rendimiento.

#### 45 *Transformación de células no productoras de nicotina*

- [000112]** Las construcciones de acuerdo con la descripción pueden usarse para transformar cualquier célula mediante una técnica de transformación adecuada, como la transformación de células de plantas por medio de *Agrobacterium*, el bombardeo de partículas, la electroporación y la fusión con polietilenglicol o la transfección mediante fosfato de calcio, DEAE-dextrano o lípidos catiónicos.

- [000113]** Las células no productoras de nicotina pueden transformarse con construcciones de ácidos nucleicos de la presente descripción sin el uso de un marcador seleccionable o visible y los organismos transgénicos pueden identificarse mediante la detección de la presencia de la construcción introducida. Por ejemplo puede medirse la presencia de una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico en una célula concreta para determinar si la célula se transformó o transfectó satisfactoriamente. Por ejemplo, y como rutina en la técnica, la presencia de la construcción introducida puede detectarse por PCR u otros procedimientos adecuados para la detección de un ácido nucleico o secuencia polipeptídica específicos. Adicionalmente, las células transformadas pueden identificarse mediante el reconocimiento de diferencias en la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula transformada en comparación con la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula sin transformar cultivada en condiciones similares. Véase el documento WO 2004/076625.

- [000114]** Para los fines de la presente descripción, se seleccionan células manipuladas por ingeniería genética que expresan *A622* y *NBB1* heterológamente.

65



**Cuantificación del contenido de alcaloides nicotínicos**

[000115] Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos. De manera similar, las células no productoras de nicotina transformadas se caracterizan por la producción de alcaloides nicotínicos.

5 [000116] Al describir una planta de la presente invención, la frase “aumento del contenido de nicotina o alcaloides nicotínicos” se refiere a un aumento de la cantidad de alcaloides nicotínicos en la planta o célula en comparación con una planta o célula de control sin transformar. Una “planta con aumento de nicotina” abarca una planta manipulada por ingeniería genética que tiene un aumento del contenido de nicotina superior al 10 % y  
10 preferentemente superior al 50 %, 100 % o 200 % del contenido de nicotina de una planta de control de la misma especie o variedad.

[000117] Una célula no productora de nicotina transformada satisfactoriamente se caracteriza por la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por ejemplo, una célula no productora de nicotina transformada puede producir nicotina,  
15 mientras que una célula de control sin transformar no puede.

[000118] Un aumento cuantitativo de los niveles de alcaloides nicotínicos puede comprobarse por varios procedimientos como, por ejemplo, por cuantificación basada en cromatografía de gas-líquido, cromatografía líquida de alto rendimiento, radioinmunoensayos y ensayos de inmunoabsorción enzimática. En la presente invención, los  
20 niveles de alcaloides nicotínicos se midieron por cromatografía de gas-líquido, con una columna capilar y un detector de ionización de llama (FDI), según se describe en Hibi y col., Plant Physiology 100: 826-35 (1992).

**Cuantificación del rendimiento**

25 [000119] Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos y del rendimiento. La producción de alcaloides nicotínicos en las plantas manipuladas por ingeniería genética se alcanza preferentemente mediante la expresión de un gen de la ruta de la biosíntesis de nicotina, tal como *A622*, *NBB1*, *PMT* o *QPT*. Según la presente invención, se expresan *A622* y *NBB1*.

30 [000120] Al describir una planta de la presente invención, la expresión “aumento del rendimiento” o “alto rendimiento” se refiere a un aumento en la cantidad de rendimiento de una planta o un cultivo de dicha planta en comparación con una planta de control con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta. Una “planta con aumento del rendimiento” abarca una planta manipulada por ingeniería genética de modo que produce lo mismo como planta o cultivo de dicha planta que una planta con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta,  
35 preferentemente más del 110 % y con mayor preferencia más del 125 % del rendimiento de una planta de control de la misma variedad o especie enriquecida en nicotina.

[000121] Un aumento cuantitativo de la eficiencia fotosintética puede determinarse por varios procedimientos como, por ejemplo, mediante la cuantificación de tasas de fotosíntesis como el intercambio gaseoso y la fijación de  
40 CO<sub>2</sub> y la fluorescencia de la clorofila. Miyagawa y col., Plant Cell Physiol. 41: 311-320 (2000). Las tasas de fotosíntesis pueden cuantificarse también por medición de los niveles de metabolitos y carbohidratos, según se describe en Leegood, Carbon Metabolism in Photosynthesis and production in a changing environment: afield and laboratory manual (eds. Hall, Scurlock, Bolhar-Nordenkamp, Leegood y Long) 247-267 (Chapman y Hall, Londres; 1993). Alternativamente, la actividad fotosintética puede calcularse sobre la base de la actividad enzimática, como la  
45 actividad de la Rubisco. Portis, A. R., J. Exp. Bot. 46: 1285-1291 (1995).

[000122] Por supuesto, un aumento del rendimiento puede determinarse mediante la medición de características más fácilmente apreciables, incluidas, pero sin limitarse a la altura de la planta, el peso, el tamaño de la hoja, el momento de floración, el número de semillas producidas y el peso de las semillas.

50

**Productos con aumento de nicotina.**

[000123] La presente invención proporciona una planta manipulada por ingeniería genética que presenta un aumento de los niveles de nicotina. También se describe una célula no productora de nicotina manipulada por  
55 ingeniería genética que produce nicotina o compuestos relacionados, en que dicha célula deriva de un organismo que no produce nicotina. A partir de una planta manipulada por ingeniería genética semejante pueden obtenerse diversos productos. Igualmente, pueden obtenerse productos a partir de células manipuladas por ingeniería genética para la producción de nicotina o compuestos relacionados.

**Plantas resistentes a herbívoros**

[000124] La nicotina sirve como un plaguicida natural que ayuda a proteger a las plantas de tabaco del daño producido por plagas. Se ha demostrado que el tabaco mejorado convencionalmente o transgénico de bajo contenido de nicotina es más susceptible al daño por insectos. Legg, P. D. y col., Can. J. Cyto., 13: 287-291 (1971);  
65 Voelckel, C. y col., Chemoecology 11: 121-126 (2001); Steppuhn, A. y col., PLoS Biol, 2(8): e217: 1074-1080 (2004). Mediante el uso de los procedimientos y construcciones de la presente invención, pueden producirse plantas con

aumento de nicotina que presentan un aumento de la resistencia al daño por insectos u otras plagas. De manera similar, puede obtenerse un aumento de la resistencia a plagas en plantas no productoras de nicotina, como *A. belladonna* y *A. thaliana*, manipuladas por ingeniería genética de acuerdo con la presente descripción para producir nicotina.

5

#### Productos con aumento de nicotina

**[000125]** Las construcciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para producir, por ejemplo, cigarrillos, cigarros y otros productos tradicionales de tabaco como rapé y snus. Adicionalmente, pueden  
10 producirse cigarrillos con aumento de nicotina que presentan una exposición reducida a componentes del humo como alquitrán, pero proporcionan un suministro de nicotina similar o mayor que los cigarrillos convencionales.

**[000126]** En la presente descripción, un producto de tabaco con aumento de nicotina puede estar en forma de tabaco de hoja, tabaco picado, tabaco cortado en hebras, tabaco molido, tabaco reconstituido, tabaco expandido o  
15 inflado y fracciones de tabaco que incluyen, por ejemplo, nicotina. Un producto de tabaco con aumento de nicotina puede incluir cigarrillos, cigarros, tabaco de pipa y cualquier forma de tabaco sin humo como rapé, snus o tabaco de mascar.

**[000127]** En la técnica del tabaco es común la mezcla de diferentes tipos o cultivares de tabaco dentro de un  
20 producto de tabaco como un cigarrillo. Por lo tanto, se apreciará que el tabaco con aumento de nicotina podría mezclarse en cualquier proporción con un tabaco sin transformar para obtener cualquier nivel deseado de contenido de nicotina, hasta el contenido de nicotina del tabaco con aumento de nicotina utilizado, para fabricar un producto de tabaco.

**[000128]** Los cigarrillos con aumento de nicotina son particularmente ventajosos porque existen estudios que demuestran que cuando se aumenta la nicotina, los fumadores inhalan menos alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., *Psychopharmacology* 96: 447-453 (1988); Fagerström, *Psychopharmacology* 77: 164-167 (1982); Russell, *Nicotine and Public Health* 15: 265-284 (2000) y Woodman y col., *European Journal of Respiratory Disease* 70: 316-321 (1987).  
25

30

**[000129]** El humo de los cigarrillos en una mezcla extremadamente compleja de más de 4.000 compuestos diferentes. Green y Rodgman, *Recent Advances in Tobacco Science* 22: 131-304 (1996); Informe del IOM, página 9 del resumen ejecutivo. El humo de los cigarrillos está compuesto de dos fases: una fase particulada, denominada comúnmente “alquitrán” o materia particulada total, y una fase de vapor que contiene gases y compuestos  
35 semivolátiles. Una definición común de “alquitrán” es el “humo seco sin nicotina” o la “materia particulada seca sin nicotina” (NFDPM) capturados por una almohadilla de Cambridge cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de fumar. Más específicamente, el “alquitrán” es la materia particulada total aislada del humo, con exclusión del agua y la nicotina. El alquitrán constituye menos del diez por ciento del peso del humo del cigarrillo. Sin embargo, el alquitrán es el componente que contiene la mayor parte de los compuestos más dañinos del humo.

40

**[000130]** Los procedimientos analíticos combinados con ensayos biológicos sensibles han conducido a la identificación de 69 carcinógenos en el humo del tabaco. Véase THE CHANGING CIGARETTE: CHEMICAL STUDIES AND BIOASSAYS, capítulo 5, *Smoking and Tobacco Control Monograph* n° 13 (Publicación del NIH n° 02-5074, octubre de 2001). Sin embargo, resulta claro para los investigadores que no todos los componentes del humo  
45 de los cigarrillos tienen la misma toxicidad. Notablemente, el primer informe del Surgeon General de los EE. UU. sobre el tabaco en 1964 llegó a la conclusión de que la nicotina probablemente no era tóxica en los niveles inhalados, con la implicación de que la fuente principal de gratificación farmacológica para los fumadores no presentaba un riesgo inmediato. El informe del General Surgeon de 1964 afirmaba en la página 74 que no hay pruebas aceptables de que una exposición prolongada a la nicotina creara cambios funcionales peligrosos de  
50 naturaleza objetiva ni enfermedades degenerativas.

**[000131]** De hecho, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. permite la venta de productos sustitutivos de nicotina como parches y chicle para uso en los tratamientos para dejar de fumar. Estos productos pueden suministrar más nicotina en un día que un paquete de cigarrillos. En la página 167 del informe del  
55 IOM se afirma que numerosos estudios sobre nicotina sugieren que no es probable que esta sea un agente cancerígeno en humanos o, cuánto más, que su carcinogenicidad sería insignificante en comparación con la de otros componentes del tabaco. Es decir, que la consideración de la nicotina como agente carcinógeno, si acaso, es insignificante en comparación con el riesgo de otros constituyentes del tabaco.

**[000132]** Los cigarrillos se evalúan generalmente mediante los métodos de la máquina de fumar de la Comisión Federal del Comercio (FTC) (en los EE. UU.) o la Organización Internacional de Normalización (ISO) que determinan, por ejemplo, la cantidad de alquitrán y nicotina generada cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de acuerdo con condiciones estándar. Véanse Pillsbury y col., *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* (1969); ISO: 4387 (1991). En general, la mayoría de los cigarrillos comerciales producen aproximadamente de 10 a 15 partes de  
65 “alquitrán” por cada parte de nicotina, medidas en miligramos, según se analiza en la solicitud PCT WO 2005/018307.

- [000133]** Muchas autoridades sanitarias creen que el régimen actual de las máquinas de fumar FTC/ISO es imperfecto porque estas metodologías no tienen en cuenta el comportamiento del fumador humano, impulsado fundamentalmente por la búsqueda de nicotina. En otras palabras, estos procedimientos no consideran el fumar compensatoriamente. El fumar compensatoriamente o la compensación, como también se denomina, significa esencialmente fumar en exceso (fumar más intensivamente), debido a la menor presencia de nicotina en el humo del tabaco o fumar en defecto (fumar menos intensivamente) debido al aumento de la presencia de nicotina. Véase Benowitz, N. *Compensatory Smoking of Low Yield Cigarettes*, Monografía 13 del NCI.
- 10 **[000134]** Actualmente se están evaluando nuevos procedimientos de máquinas de fumar, especialmente aquellos que consideran fumar compensatoriamente marcas de baja producción. Un ejemplo es un procedimiento que implica el ajuste de los parámetros al fumar, de modo que las marcas con menores producciones de nicotina según el ISO se fuman en la máquina con mayor intensidad. Kozlowski y O'Connor *Lancet* 355: 2159 (2000). Otros procedimientos propuestos miden la producción de toxinas con respecto a unidades de nicotina o para una producción de nicotina "objetivo" definida. Esto se consigue, por ejemplo, por variación sistemática del volumen de bocanada y el intervalo de bocanadas y el bloqueo de los orificios de ventilación hasta alcanzar la producción de nicotina objetivo. Los cigarrillos pueden evaluarse entonces según el esfuerzo requerido para conseguir la producción de nicotina objetivo, así como según el suministro de toxinas para tal producción. Los consumidores se beneficiarían de estos procedimientos de máquinas de fumar, dado que podrían llevarse a cabo comparaciones de toxinas específicas entre marcas diferentes.
- 15 **[000135]** Algunos estudios han sugerido que muchos fumadores inhalan la misma cantidad de humo con la mayoría de los cigarrillos "light" y "ultra-light" que con los cigarrillos de sabor pleno (Gori y Lynch, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 5: 314-326). Los fumadores pueden compensar o fumar los cigarrillos de menor producción de humo (según el procedimiento de la FTC o el ISO) de manera más agresiva (que los cigarrillos de mayor producción) con el fin de obtener el deseado impacto de nicotina y la sensación de humo en la boca, que importantes propiedades sensoriales. Rose J. E. "The role of upper airway stimulation in smoking," en *Nicotine Replacement: A Critical Evaluation*, págs. 95-106, 1988.
- 25 **[000136]** La manera en que un fumador puede compensar incluye la frecuencia de bocanadas por cigarrillo y el volumen de inhalación de humo en dichas bocanadas, el tiempo que se retiene el humo inhalado antes de exhalarlo, el número de cigarrillos fumados durante un periodo de tiempo específico y el porcentaje de cada cigarrillo que se fuma (hasta donde se fuma el cigarrillo).
- 30 **[000137]** Cuando el porcentaje de nicotina por unidad de volumen de humo inhalado aumenta, muchos fumadores pueden compensar e inhalar menos humo. Gori G. B., *Virtually Safe Cigarettes. Reviving an opportunity once tragically rejected*. IOS Press. Ámsterdam, (2000). Cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el tabaco de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo. Más específicamente, cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el relleno de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo.
- 35 **[000138]** "Relleno" significa cualquier material fumable que se enrolla dentro de un cigarrillo o dispositivo similar a un cigarrillo e incluye (a) todos los tabacos, incluidos, pero sin limitarse a los tabacos reconstituidos y expandidos, (b) cualquier sustituto distinto del tabaco que puede acompañar a (a), (c) envoltorios de tabaco, (d) otros aditivos, incluidos saborizantes que se añaden a (a), (b) o (c). Un dispositivo similar a un cigarrillo es cualquier dispositivo destinado específicamente al suministro de nicotina a través de un aerosol de "humo" alternativo formado por el calentamiento de materiales de tabaco. Lo característico de tales dispositivos es que presentan un alto contenido de glicerina o un sustituto de glicerina con una combustión pirolítica mínima o nula. Cuando se calienta la glicerina, esta se vaporiza rápidamente y forma un aerosol que puede inhalarse y que es muy similar en aspecto y sensación al humo de los cigarrillos convencionales.
- 40 **[000139]** Por lo tanto, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o en un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes (incluidos, pero sin limitarse al tipo de filtro, el papel del cigarrillo, incluida su porosidad, la envoltura del filtro y el papel boquilla utilizados y el grado de ventilación del filtro), tendrá que duplicarse aproximadamente para una duplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Además, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes, tendrá que triplicarse aproximadamente para una triplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Los cálculos en esta sección se refieren a nicotina protonada en el humo corriente de un cigarrillo con el aumento descrito de los niveles de nicotina y no a nicotina "libre" o "volátil".
- 45 **[000140]** En un caso preferido de la divulgación se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende una planta de tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es de hasta el doble. En otro caso preferido de la presente divulgación se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es superior al doble.
- 50 **[000141]** El programa de ensayo de variedades llevado a cabo por el Servicio de Investigación Agrícola de la Universidad del Estado de Carolina del Norte evalúa las líneas de mejora a través del *Programa Regional de*

Mínimos Estándares y las líneas comerciales a través del *Ensayo Oficial de Variedades de Carolina del Norte* (NCOVT). La concentración total de alcaloides de variedades comerciales curadas al humo descrita en la media de tres años del NCOVT, desde 2001 a 2003, varía del 2,45 al 3,17 %. Smith y col., "Variety Information," capítulo 3 en: NORTH CAROLINA OFFICIAL VARIETY TEST (2004), tabla 3.1. La media de tres años de la concentración total de alcaloides fue del 2,5 % para K-326, el cultivar utilizado en los ejemplos 4-6 y 9-14. Para medir el contenido de alcaloides totales de los cultivares de tabaco en el NCOVT anterior y con el fin de medir el contenido de alcaloides totales del tabaco y las plantas con aumento de nicotina de la presente invención se usa el procedimiento espectrométrico. Grupo de Asesoramiento Técnico de los EE. UU., ISO/TC 126 - Tobacco and tobacco products: ISO/DIS 2881. Según se describe en este documento, incluidas las figuras, parece que algunas plantas con aumento de nicotina tienen la capacidad de al menos duplicar o incluso más que triplicar la acumulación de nicotina de los controles naturales K326. Igualmente, en los ejemplos 4 a 6, la sobreexpresión de *NBB1* y *A622* produce un aumento de nicotina del doble o incluso del triple en comparación con los controles naturales.

**[000141]** El "curado" es el proceso de envejecimiento que reduce la humedad y provoca la destrucción de la clorofila, lo que da lugar a hojas de tabaco con un color dorado, y por el que el almidón se convierte en azúcar. Por lo tanto, el tabaco curado tiene mayor contenido de azúcares reductores y menor contenido de almidón que la hoja verde recolectada. El "tabaco curado al humo" se refiere a un procedimiento de secado de las plantas de tabaco en un granero ventilado con calor y se caracteriza por un color único, un alto contenido de azúcares reductores, un cuerpo de medio a pesado y excepcionalmente suave al fumar. Bacon y col., Ind. Eng. Chem. 44: 292 (1952).

**[000142]** Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) son una clase de carcinógenos que se forman predominantemente durante el curado y el procesamiento. Hoffman, D. y col., J. Natl. Cancer Inst. 58: 1841-4 (1977); Wiernik, A. y col., Recent Adv. Tob. Sci, 21: 39-80 (1995). Las TSNA como 4-(*N*-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*'-nitrosornicotina (NNN), *N*'-nitrosoanatabina (NAT) y *N*'-nitrosoanabasina (NAB) se forman por la *N*-nitrosación de nicotina y otros alcaloides secundarios de *Nicotiana*, como nornicotina, anatabina y anabasina.

**[000143]** Las plantas con aumento de nicotina pueden contener más nitrosaminas, ya que existe una correlación positiva entre el contenido de alcaloides en tabaco y la acumulación de TSNA. Por ejemplo, se ha encontrado un coeficiente de correlación significativa de 0,76 entre anatabina y NAT. Djordjevic y col., J. Agric. Food Chem., 37: 752-56 (1989). Sin embargo, las patentes de los EE. UU. n° 5.803.081, n° 6.135.121, n° 6.805.134, n° 6.895.974 y n° 6.959.712 y las solicitudes publicadas de los EE.UU. 2005/0034365, 2005/0072047, 2005/0223442, 2006/0041949, así como la solicitud PCT publicada WO 2006/091194 y otras describen metodología para reducir las nitrosaminas específicas del tabaco que puede aplicarse a un producto de tabaco que utiliza la presente divulgación.

**[000144]** Por consiguiente, la presente divulgación proporciona construcciones y metodología para la producción de cigarrillos y otros productos de tabaco que contienen mayores niveles de nicotina. Un cigarrillo de exposición reducida deseable debería suministrar a un fumador el nivel deseado de nicotina por cigarrillo de la manera lo más eficiente posible mientras mantiene un sabor aceptable. Véase el documento WO 05/018307.

#### 40 Tabaco reconstituido, tabaco expandido y mezcla

**[000145]** El tabaco con aumento de nicotina puede usarse también para producir láminas de tabaco reconstituido (Recon) y tabaco expandido o tabaco inflado. El Recon puede producirse a partir de los siguientes: polvo de tabaco, tallos, pequeñas partículas de hojas, otros productos secundarios del procesamiento del tabaco y la fabricación de cigarrillos y en algunos casos directamente la hoja entera. El proceso Recon, que varía según el fabricante, es muy semejante al proceso típico de fabricación de papel y supone el procesamiento de diversas fracciones de tabaco y el cortado posterior de las láminas de Recon en una forma y tamaño que se asemeja al tabaco de los cigarrillos (tabaco cortado en hebras).

**[000146]** Además, el tabaco con aumento de nicotina puede usarse de acuerdo con la presente invención para producir tabaco expandido, también conocido como tabaco inflado, que es un componente importante en muchas marcas de cigarrillos. El tabaco expandido se prepara a través de la expansión de gases adecuados, en lo que el tabaco se "infla", lo que resulta en una menor densidad y mayor capacidad de relleno, lo que a su vez, reduce el peso del tabaco usado en los cigarrillos. Al usar el tabaco con aumento de nicotina como material de partida, los cigarrillos fabricados con el tabaco expandido resultante producirán menores proporciones de sustancias químicas tóxicas, como alquitrán y monóxido de carbono, con respecto a nicotina.

**[000147]** El tabaco expandido con aumento de nicotina, el Recon con aumento de nicotina y el tabaco cortado en hebras con aumento de nicotina pueden mezclarse en cualquier proporción entre los tres o con cualquier proporción de tabaco expandido sin transformar, Recon sin transformar o tabaco cortado en hebras sin transformar para producir relleno de cigarrillos con un contenido de nicotina diverso. Cualquiera de estas mezclas se incorpora después en el proceso de fabricación de cigarrillos de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica.

**[000148]** También se fabrican otros productos de tabaco distintos de los cigarrillos con el tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética, mediante el uso de cualquier material de plantas de tabaco descrito en

este documento de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. En una realización, se fabrican productos de tabaco que comprenden material obtenido de plantas de tabaco con aumento de nicotina. El mayor contenido de nicotina puede ser de hasta más del triple del contenido de los cultivares naturales.

## 5 Enzimas y análogos de alcaloides nicotínicos

**[000149]** Además de los productos de tabaco tradicionales, como cigarrillos y tabaco de mascar, la presente invención proporciona metodología para la producción de nicotina y análogos de nicotina, así como enzimas para la síntesis de nicotina y análogos de nicotina. Estos compuestos pueden ser producidos por plantas productoras de nicotina y células no productoras de nicotina manipuladas por ingeniería genética, así como en un sistema sin células/*in vitro*.

**[000150]** Dado que existen estudios recientes que sugieren un papel para los receptores de nicotina en el tratamiento de diversas dolencias y trastornos, como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la disfunción de los sistemas nerviosos central y autónomo, así como adicciones, existe la necesidad de fuentes de ligandos para receptores de nicotina. Por ejemplo, los procedimientos y construcciones de la presente invención pueden usarse para la producción de alcaloides nicotínicos. Se ha demostrado que cultivos de raíces capilares transgénicas que expresan *PTM* en exceso proporcionan un medio eficaz para la producción comercial a gran escala de escopolamina, un alcaloide tropánico de importancia farmacéutica. Zhang y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101: 6786-91 (2004). Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de alcaloides nicotínicos en cultivos de raíces capilares de tabaco mediante la expresión de al menos uno de *A622* y *NBB1*. Igualmente, la presente descripción contempla sistemas de cultivos celulares como cultivos bacterianos o de células de insectos para la producción de cantidades a gran escala o comerciales de nicotina mediante la expresión de *A622* y *NBB1*.

**[000151]** Adicionalmente, pueden prepararse productos directamente mediante el uso de la actividad de las enzimas *NBB1* y *A622*. Por ejemplo, pueden usarse enzimas *NBB1* y *A622* recombinantes para la síntesis o síntesis parcial de alcaloides nicotínicos o análogos de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de *A622* y *NBB1* por diversos procedimientos que incluyen la extracción de la enzima recombinante de una planta, célula o sistema de cultivo manipulados por ingeniería genética, incluidos, pero sin limitarse a cultivos de raíces capilares, cultivos de células de insectos, bacterias, hongos, plantas, algas y mamíferos o *in vitro*.

**[000152]** A continuación se presentan algunos ejemplos específicos de procedimientos para la identificación de secuencias codificantes de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotina, así como para la introducción del gen diana para producir plantas transformantes. Pretenden ser ejemplos y no limitaciones de la presente invención.

### EJEMPLO 1: Identificación de *NBB1* como gen regulado por los locus *NIC*

**[000153]** Una micromatriz de ADNc preparada a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, véase Katoh y col., Proc. Japan Acad. 79, serie B: 151-54 (2003), se usó para buscar nuevos genes controlados por los locus *NIC* reguladores de la biosíntesis de nicotina.

**[000154]** Los ADNc de *N. sylvestris* se amplificaron por PCR y se aplicaron sobre portaobjetos con un recubrimiento especular (tipo 7 star, Amersham) mediante un aplicador de micromatrices Lucidea de Amersham. El ADN se inmovilizó en la superficie del portaobjetos por entrecruzamiento con UV (120 mJ/m<sup>2</sup>). Se cultivaron 21 plántulas de *N. tabacum* Burley (tipo natural (WT) y *nic1nic2*) en ½x medio B5, enriquecido con sacarosa al 1,5 % (peso normalizado) y goma de gelano al 0,35 % (peso normalizado) (Wako) en recipientes Agriplot (Kirin).

**[000155]** Se recolectaron las raíces de plántulas de ocho semanas, que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. A partir de las raíces congeladas se aisló el ARN total mediante el kit Plant RNeasy Mini (Qiagen) y el ARNm se purificó con el kit para minipreparaciones de ARNm GenElute (Sigma). El ADNc se sintetizó a partir de 0,4 µg del ARNm purificado con el kit para micromatrices LabelStar (Qiagen) en presencia de Cy3 o Cy5-dCTP (Amersham). La hibridación del ADNc con los portaobjetos con las micromatrices y los lavados tras la hibridación se realizaron con una máquina de hibridación Lucidea SlidePro (Amersham). Las micromatrices se examinaron mediante un escáner FLA-8000 (Fujifilm). La intensidad de la señal en las imágenes de las micromatrices obtenidas se cuantificó con el programa ArrayGauge (Fujifilm). Las sondas de ADNc del tabaco natural y del tabaco *nic1nic2* se marcaron con Cy3 y Cy5 en combinaciones de pares recíprocos. Las señales de hibridación se normalizaron teniendo en cuenta la intensidad total de la señal de los colorantes. Se identificaron los clones de ADNc que hibridaron con las sondas naturales con una intensidad de más del doble en comparación con las sondas *nic1nic2* y estos incluyeron *NBB1*.

**[000156]** Un ADNc de *NBB1* de longitud completa se obtuvo por amplificación RACE de los extremos 5' y 3' a partir de ARN total de *N. tabacum* mediante un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech). El ADNc de *NBB1* de longitud completa resultante se clonó en el vector pGEM-T (Promega) para dar lugar a pGEMTNBB1cDNAfull.

**[000157]** La secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de *NBB1* se determinó en las dos hebras mediante un analizador genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems) y un kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). El ADNc de *NBB1* de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia proteínica incluye un motivo de unión a FAD. En el extremo N se encuentra un potencial péptido señal vacuolar.

#### **EJEMPLO 2: caracterización de *NBB1***

10 **[000158]** La expresión de *NBB1* en plantas de tabaco se investigó por análisis de transferencia Northern.

**[000159]** Se cultivaron *in vitro* plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21 (abreviada a continuación como WT) y líneas mutantes, en las cuales se habían introducido las mutaciones *nic1*, *nic2* o ambas *nic1* y *nic2* en el fondo genético Burley 21, durante dos meses a 25 °C con 150/1 mol de fotones/m<sup>2</sup> de luz (16 h de luz, 8 h de oscuridad) en ½x medio B5 con sacarosa al 3 % y goma de gelano al 0,3 %. Las plantas se trataron con vapor de metiljasmonato mediante la adición de 0,5 ml de metiljasmonato 100 µM a un recipiente Agriplot (Kirin, Tokio, Japón) con una capacidad para medio sólido de 80 cm<sup>3</sup> y una capacidad de gas de 250 cm<sup>3</sup> que contenía las plantas. Los momentos de tratamiento se fijaron a 0 h y 24 h. Se recogieron las partes de las raíces y las hojas (hojas 2ª a 6ª de una planta con un total de siete a diez hojas) de las plantas, que inmediatamente se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido.

**[000160]** El ARN se extrajo mediante un kit RNeasy Midi (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Sin embargo, se añadió polivinilpirrolidona hasta una concentración del 1 % al tampón RL T del kit de Qiagen. La operación de la columna se llevó cabo dos veces para aumentar la pureza del ARN.

25 **[000161]** La transferencia de ARN se realizó de acuerdo con los procedimientos indicados por Sambrook y Russell (Sambrook, J. y col., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 7 (2001)).

**[000162]** Como molde para la sonda se usó el fragmento de secuencia desde 1.278 pb hasta el final (1.759 pb) de la secuencia nucleotídica de *NBB1* (SEQ ID NO: 1). El molde se preparó por amplificación del clon de ADNc por PCR mediante los cebadores siguientes:

cebador 1: GGAAACTAACAACGGAATCTCT

cebador 2: GATCAAGCTATTGCTTTCCCT

35 **[000163]** La sonda se marcó con <sup>32</sup>P mediante un kit de marcaje Bcabeat (Takara) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridación se llevó a cabo con el tampón ULTRAhyb (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

40 **[000164]** La sonda de *PTM* se preparó a partir de una secuencia de *PTM* clonada en el vector pcDNAII en *E. coli* (Hibi y col., 1994). El plásmido se extrajo y purificó de *E. coli* mediante un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), se trató con las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III por procedimientos ordinarios y el ADN digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kb se recogieron mediante el kit de extracción para geles QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN recogidos se marcaron con <sup>32</sup>P por los mismos procedimientos usados para la sonda de *NBB1* y se hibridaron.

**[000165]** Como muestra la figura 1, *NBB1* y *PMT* tienen el mismo patrón de expresión en plantas de tabaco. La prueba de que *NBB1* está implicado en la biosíntesis de nicotina es que, al igual que *PMT*, *NBB1* está bajo el control de los genes *NIC* y muestra un patrón de expresión similar al de *PMT*.

#### **EJEMPLO 3: análisis filogenético de *NBB1***

**[000166]** El polipéptido *NBB1* tiene un 25 % de identidad y un 60 % de homología con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (BBE). Dittrich y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 9969-73 (1991)). Un alineamiento del polipéptido *NBB1* con EcBBE se muestra en la figura 2.

**[000167]** Se construyó un árbol filogenético usando las secuencias del polipéptido *NBB1* y de polipéptidos de plantas similares a BBE, basado en Carter y Thornburg, Plant Physiol. 134: 460-69 (2004). El análisis filogenético se realizó por el procedimiento de unión de vecinos con el programa CLUSTAL W. Los números indican valores de iniciales de 1.000 réplicas. Las secuencias usadas fueron EcBBE, BBE de amapola de California (nº de acceso de GenBank AFOOS655); PsBBE, probable reticulina-oxidasa de adormidera (*Papaver somniferum*) (AF025430); BsBBE, BBE de agracejo (*Berberis stolonifera*) (AF049347); VuCPRD2, proteína inducida por la sequía de caupí (*Vigna unguiculata*) (AB056448); nectarina V de *Nicotiana* sp. (AFS034411AF503442); HaCHOX, carbohidrato-oxidasa de girasol (*Helianthus annuus*) (AF472609); LsCHOX, carbohidrato-oxidasa de lechuga (*Lactuca sativa*) (AF472608); y 27 genes de *Arabidopsis* (Atlg01980, Atlg11770, Atlg26380, Atlg26390, Atlg26400, Atlg26410, Atlg26420, Atlg30700, Atlg30710, Atlg30720, Atlg30730, Atlg30740, Atlg30760, Atlg34575, At2g34790, At2g34810,

At4g20800, At4g20820, At4g20830, At4g20840, At4g20860, At5g44360, At5g44380, At5g44390, At5g44400, At5g44410 y At5g44440).

**[000168]** Los resultados se muestran en la figura 3. Las tres BBE conocidas forman un clado separado y están subrayadas e indicadas como "BBE verdaderas". La secuencia de NBB1 no es muy similar a ninguna de las BBE ni a las proteínas similares a BBE y se separa de las otras secuencias en la base del árbol. La única otra proteína similar a BBE descrita del género *Nicotiana*, nectarina V, una proteína descrita en el néctar del híbrido ornamental de *Nicotiana langsdorffii* x *N. sanderae*, Carter y Thornburg (2004), se agrupa con la proteína inducida por la sequía de caupí y varias proteínas potencialmente similares a BBE de *Arabidopsis*. Dado que el néctar del tabaco ornamental carece de alcaloides y la nectarina V tiene actividad de glucosa-oxidasa, se concluyó que la nectarina V está implicada en la defensa contra microorganismos en las flores y no es probable que tenga ningún papel en la síntesis de alcaloides (misma referencia).

#### **EJEMPLO 4: sobreexpresión de *NBB1* en raíces capilares de tabaco**

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1*

**[000169]** Se amplificó un fragmento attB-NBB1 por PCR con el vector pGEMTNBB1cDNAfull del ejemplo 1 como molde y dos pares de cebadores; un par para la amplificación específica del gen *NBB1* (cebadores específicos del gen) y otro par para añadir las secuencias attB (cebadores adaptadores). Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-NBB1, se creó por una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, attB-NBB1, y pDONR221 (Invitrogen).

Cebadores específicos del gen

NBB1-attB1 5' AAAAAGCAGGCTCACCATGTTTCCGCTCATAATTCTG  
NBB1-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTCATTCAGTCTATACTTGTGC

Cebadores adaptadores

adaptador attB1 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT  
adaptador attB2 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

*Descripción de pTobRD2-DEST*

**[000170]** La región promotora TobRD2 (SEQ ID NO: 5 en el documento WO9705261), de 1.031 pb, se amplificó usando el ADN genómico de Burley 21 como molde y los cebadores específicos del promotor TobRD2 y después se digirió con *HindIII* y *XbaI*.

**[000171]** Cebadores específicos del promotor TobRD2:

TobRD2-01F 5' AAAGCTTGGAACATATTCAATACATTGTAG  
se subraya el sitio *HindIII*  
TobRD2-02R 5' TCTAGATTCTACTATTTTATAAGTG  
se subraya el sitio *XbaI*

**[000172]** El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* de pBI101H (suministrado por Dr. Shuji Yokoi de NAIST; ref.: Molecular Breeding 4: 269-275, 1998), lo que resultó en el plásmido pTobRD2-BI101H. Una casete para el sistema GATEWAY, que contenía los sitios de recombinación attR flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, se clonó entre los sitios *XbaI* y *SacI* del vector binario pTobRD2-BI101H para producir el vector binario pTobRD2-DEST, que tiene una región de ADN-T que contiene una casete de expresión del gen *NPTII* (promotor Nos - ORF II de neomicina-fosfotransferasa - terminador Nos) y una casete de expresión del gen *HPT* (promotor CaMV35S - ORF de higromicina-fosfotransferasa - terminador Nos) como marcadores de selección flanqueando al promotor TobRD2 adyacente a una casete de GATEWAY. En la figura 4A se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-DEST.

**[000173]** La ORF de *NBB1* se transfirió mediante una reacción LR desde el vector pDONR221-NBB1 al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST, diseñado para expresar una ORF clonada bajo el control del promotor TobRD2. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T del vector de expresión final pTobRD2-NBB1ox.

*Producción de raíces capilares transgénicas*

**[000174]** El vector binario pTobRD2-NBB1ox se introdujo por electroporación en la cepa 15834 de *Agrobacterium rhizogenes*. Se transformaron plantas naturales de *Nicotiana tabacum* cv. K326 mediante *A. rhizogenes* por el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según se describe en Kanegae y col., Plant

Physiol. 105:2: 483-90 (1994). Como marcador de selección para las líneas transformadas por pTobRD2-NBB1ox (líneas TN) se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio B5). *A. rhizogenes* natural se usó para producir líneas de raíces capilares de control (WT). Las raíces capilares de tabaco se cultivaron en medio B5 líquido a 27 °C en condiciones de oscuridad durante dos semanas y después se recolectaron.

5

#### *Procedimiento para el análisis de la expresión*

**[000175]** Los niveles de expresión de la proteína NBB1 se analizaron por inmunotransferencia. Las raíces capilares se congelaron en nitrógeno líquido e inmediatamente se homogeneizaron con un mortero y mano en un tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ditiotretol 200 mM. Después de la centrifugación de los homogeneizados, las proteínas en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con un suero de conejo dirigido contra NBB1. Los procedimientos detallados han sido descritos previamente. Shoji y col., Plant Mol. Biol., 50: 427-440 (2002). El análisis de inmunotransferencia con el antisuero contra NBB1 muestra un aumento de los niveles de la proteína NBB1 para las líneas de raíces capilares transgénicas TN9 y TN17. Véase la figura 5A.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[000176]** Las raíces capilares transgénicas se cultivaron durante dos semanas, se recolectaron y se liofilizaron. A 19 mg de la muestra liofilizada se le añadieron 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N. Esta suspensión se sometió a ultrasonidos durante 15 min y se filtró. Se añadió hidróxido de amonio (0,1 ml de NH<sub>3</sub> al 28 %; Wako) a 1 ml del filtrado y la mezcla se centrifugó durante 10 min a 15.000 rpm. Una muestra del sobrenadante (1 ml) se cargó en una columna Extrelut-1 (Merck) y se dejó reposar durante 5 min. Los alcaloides se eluyeron con 6 ml de cloroformo. La fracción de cloroformo eluida se secó a presión reducida y 37 °C en un evaporador (concentrador Taitec TC-8). La muestra seca se disolvió en 50 µl de una disolución de etanol que contenía dodecano al 0,1 %. Para el análisis de las muestras se usó un cromatógrafo de gases (GC-14B, Shimadzu) equipado con una columna capilar (columna Rtx-5Amine, Restec) y un detector FID. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La temperatura de inyección y del detector fue de 300 °C. Se inyectó una muestra de 1 µl de la preparación de alcaloides purificados y el contenido de alcaloides se midió por el procedimiento del estándar interno.

**[000177]** Las líneas de raíces capilares transformadas con el vector para la sobreexpresión de NBB1, pTobRD2-NBB1ox, (TN9, TN17) muestran un aumento de los niveles de nicotina y nor nicotina en comparación con las líneas de raíces capilares naturales. Véase la figura 6.

### **EJEMPLO 5: Sobreexpresión de A622 en raíces capilares de tabaco**

#### *Preparación de una construcción para la sobreexpresión de A622*

40

**[000178]** Se amplificó un fragmento attB-A622 con el vector pcDNAII-A622, según Hibi y col, Plant Cell 6: 723-35 (1994), como molde, los cebadores específicos de A622 siguientes y los cebadores adaptadores según se describen anteriormente en el ejemplo 4.

45 Cebadores específicos del gen

A622-attB1 5' AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTTGTATCAGAGAAAAGCA  
A622-attB2 5' AGAAAGCTGGGTCCTAGACAAATTTGTTGTAGAACTCGTCG

**[000179]** El fragmento de A622 amplificado se clonó en el vector pDONR221 mediante una reacción BR, lo que resultó en pDONR-A622, y después el fragmento de A622 se transfirió de pDONR-A622 a pTobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión resultante se denominó pTobRD2-A622ox. En la figura 4C se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox.

55 *Producción de raíces capilares transgénicas*

**[000180]** Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox se denominaron líneas TA y se cultivaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4.

#### *Procedimiento para el análisis de la expresión*

**[000181]** Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4, excepto porque para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21 transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 demostraron tener



mayores niveles de la proteína A622. Véase la figura 5B.

*Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

- 5 **[000182]** Los alcaloides del tabaco se extrajeron, purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21, transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 presentaron mayores niveles de nicotina y nornicotina. Véase la figura 6.

**EJEMPLO 6: sobreexpresión de NBB1 y A622 en raíces capilares de tabaco**

10

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de A622 y NBB1*

- [000183]** Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas A622 y NBB1 a partir de un único ADN-T, las casetes de expresión TobRD2-A622 y TobRD2-NBB1 se clonaron en tándem en un vector binario. La casete  
15 TobRD2-A622 se escindió de pTobRD2-A622ox con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-NBB1ox. El vector resultante para la sobreexpresión de ambos NBB1 y A622 se denominó pTobRD2-A622ox-NBB1ox. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox.

20 *Producción de raíces capilares transgénicas*

- [000184]** Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox-NBB1ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox se denominaron líneas TNA y se cultivaron según se  
25 describe anteriormente en el ejemplo 4.

*Procedimiento para el análisis de la expresión*

- [000185]** Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4,  
30 excepto porque para la detección de las proteínas se usó suero de ratón dirigido contra A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1. La línea de raíces capilares TNA8, muestra un aumento del nivel de expresión de ambas proteínas NBB1 (véase la figura 5A) y A622 (véase la figura 5B) en comparación con las líneas de raíces capilares naturales.

35 *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

- [000186]** Los alcaloides del tabaco se extrajeron de la línea de raíces capilares TNA8, se purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Los niveles de nicotina y nornicotina son mayores en la línea TNA8 que en las líneas de raíces capilares naturales. (Véase la figura 6).

40

**EJEMPLO DE REFERENCIA 7: plantas transgénicas de A. belladonna que expresan la proteína A622.**

- [000187]** *Atropa belladonna* produce los alcaloides tropánicos hiosciamina y escopolamina, que derivan del catión N-metilpirrolinio, pero no contiene alcaloides nicotínicos, posiblemente debido a la ausencia de los genes *NBB1* y  
45 A622.

- [000188]** El ADNc de A622 de tabaco con un sitio *NcoI* introducido en el primer ATG se escindió del vector pcDNAII-A622 (Hibi y col., 1994) como fragmento *NcoI-BamHI* y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador duplicado. Esta casete para la  
50 sobreexpresión de A622 se escindió con *HindIII* y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de A622 pGA-A622.

*Producción de plantas transgénicas*

- 55 **[000189]** El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. belladonna* con *A. tumefaciens* con el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección para la transformación por pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio MS/B5). A partir de los discos de hoja se regeneraron plantas transgénicas para 35S-A622, que se cultivaron a 22 °C en una cámara climática en  
60 condiciones de luz continua.

*Procedimiento para el análisis de la expresión*

- [000190]** Las proteínas totales se extrajeron de las hojas de plantas naturales y plantas 35S-A622 T1, según se describe anteriormente en el ejemplo 5. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con suero de ratón dirigido contra A622. Para el análisis de alcaloides se usaron los tejidos de hojas de plantas de la generación T1

autopolinizadas que contenían grandes cantidades de la proteína A622, como la línea C1 n°3 (véase la figura 7).

#### Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides

- 5 **[000191]** Los alcaloides nicotínicos en plantas transgénicas de *A. belladonna* se extrajeron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se purificaron básicamente según se ha descrito (Hashimoto y col., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La introducción de solo A622 en *A. belladonna* no resultó en la acumulación de nicotina ni de otros alcaloides nicotínicos.

#### 15 **EJEMPLO DE REFERENCIA 8: raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan las proteínas NBB1 y A622**

##### Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1

- 20 **[000192]** Para investigar si la combinación de NBB1 y A622 es suficiente para la reacción de acoplamiento de alcaloides nicotínicos, se produjeron raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresaban a la vez A622 y NBB1 mediante la transformación de hojas de las plantas de *Atropa* que expresaban A622 del ejemplo 7 con una cepa 15834 de *A. rhizogenes* que contenía un vector de expresión de NBB1.

##### Descripción de pBI101H-E2113-DEST

- 25 **[000193]** El vector binario pBE2113 que contiene el promotor CaMV35S con un potenciador duplicado (EI2) y la secuencia de la región 5' del virus del mosaico del tabaco ( $\Omega$ ) se obtuvo de Dr. Yuko Ohashi, Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos (Tsukuba, Japón), véase Plant Cell Physiol. 37: 49-59 (1996), y se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación attR flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios XbaI y SacI en el vector, lo que sustituyó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. El vector binario de destino resultante se digirió con HindIII y SacI y el fragmento HindIII-SacI que contenía la casete EI2-35S-S2-GATEWAY se clonó entre los sitios HindIII y SacI de pBI101H. El vector binario de destino resultante se denominó pBI101H-E2113-DEST. En la figura 4E se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST.

- 30 **[000194]** La ORF de NBB1 se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pBI101H-E2113-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión se denominó pEI235S $\Omega$ -NBB1. En la figura 4F se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pEI235S $\Omega$ -NBB1.

#### 40 **Producción de raíces capilares transgénicas**

- [000195]** El vector binario pEI235S $\Omega$ -NBB1 se introdujo en la cepa 15834 de *A. rhizogenes* por electroporación. A continuación, se transformaron tejidos de hoja de plantas de la generación T1 que contenían una casete 35S-A622 de expresión de A622 (línea C1 n° 3) con el *A. rhizogenes* que contenía pEI235S $\Omega$ -NBB1 mediante el procedimiento de los discos de hoja, según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección se usó la resistencia a higromicina (30 mg/l en medio B5). Las raíces capilares transgénicas que contenían el ADN-T de pEI235S $\Omega$ -NBB1 (línea E) y raíces capilares transgénicas infectadas con *A. rhizogenes* natural, sin ADN-T, como control (línea WT) se cultivaron en el medio líquido MS/B5 durante dos semanas y entonces se recolectaron.

#### 50 **Análisis de la expresión**

- [000196]** Las proteínas totales se extrajeron y se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622, mientras que para la detección de la proteína NBB1 se usó suero de conejo dirigido contra NBB1. Una línea transgénica de raíces capilares de *A. belladonna* (E2) expresa grandes cantidades de las dos proteínas NBB1 y A622 (véase la figura 8).

#### Análisis de alcaloides

- 60 **[000197]** Las raíces capilares de *A. belladonna* transgénica E2 y WT se cultivaron durante tres semanas en 10 ml del medio líquido MS/B5 con 100 mg/ml de ácido nicotínico. Los alcaloides nicotínicos en las raíces capilares de E2 y WT se extrajeron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se purificaron, básicamente según se ha descrito (Hashimoto et al., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a

150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min.

[000198] Se detectó un nuevo pico pequeño pero distinto (véase el pico 5 en la figura 9). En las raíces capilares de la línea WT no se detectó ningún pico correspondiente al pico 5. El compuesto del pico 5 mostró un perfil de fragmentación en EM idéntico al de la nicotina, según se muestra en la figura 10. Esto demuestra que la expresión de NBB1 y A622 exógenas es suficiente para la formación de nicotina en raíces capilares de *A. belladonna*.

#### 10 EJEMPLO 9: aumento del contenido de nicotina por la expresión de *PMT* bajo el control del promotor de A622

*Descripción de pA622pro-DEST*

[000199] pA622pro-DEST tiene la casete de expresión del gen *NPTII* y la casete de expresión del gen *HPT* como marcadores de selección. El promotor de A622 de 1.407 pb se amplificó mediante un vector que contenía el promotor de A622 (Shoji y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-440 (2002)) como molde y los cebadores específicos del promotor de A622 que se muestran a continuación y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBII01H. El vector binario se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector binario. Véase la figura 11A.

Cebadores específicos del promotor de A622

25 A622pro-OIF 5' AAAAGCTTAGATCTCTCTTATGTTTCATG  
se subraya el sitio *HindIII*  
A622pro-02R 5' TCTAGATTTACTCCTAGGGGAAGAAAAAAGTAGC  
se subraya el sitio *XbaI*

#### 30 Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT*

[0200] Se amplificó un fragmento *attB*-*PMT* usando un vector con *PMT* de tabaco, en el que la ORF de *PMT* (número de acceso de NCBI D28506) se había clonado en el sitio *BstXI* de pcDNAII (Invitrogen) (véase SEQ ID NO: 7B), como molde, los cebadores específicos del gen mostrados a continuación y cebadores adaptadores de la secuencia *attB*, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-*PMT*, se creó mediante una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, *attB*-*PMT*, y pDONR221 (Invitrogen).

Cebadores específicos del gen

40 *PMT*-*attB1* 5' AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGAAGTCATATC  
*PMT*-*attB2* 5' AGAAAGCTGGGTTTAAGACTCGATCATACTTC

[0201] La ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-*PMT* al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-*PMT*ox. Véase la figura 11B.

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

[0202] El vector pA622pro-*PMT*ox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

*Análisis de alcaloides*

55 [0203] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con pA622pro-*PMT*ox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete AG-GUS. Véase la figura 12.

#### 60 EJEMPLO 10: aumento del contenido de nicotina por la expresión de *PMT* bajo el control del promotor *TobRD2*

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT**

65 [0204] La ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-*PMT* al vector binario de GATEWAY

pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pTobRD2-PMTox. Véase la figura 11C.

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

5

**[0205]** El vector pTobRD2-PMTox se transformó en la cepa ERA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

10 *Análisis de alcaloides*

**[0206]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS. Véase la figura 13.

**EJEMPLO 11: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor de A622**

20

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT*

**[0207]** El fragmento de la ORF de QPT (SEQ ID NO: 5B) se amplificó usando el vector pBJY6 (proporcionado por Dr. Kenzo Nakamura, Universidad de Nagoya, Japón) como molde y los cebadores específicos del gen mostrados a continuación. Se creó un clon de entrada de GATEWAY, pENTR-QPT, mediante una reacción de clonación TOPO.

*Cebadores específicos del gen QPT*

QPT-F 5' CACCATGTTTAGAGCTATTCC

30 QPT-R 5' TCATGCTCGTTTTGTACGCC

**[0208]** La ORF de QPT se transfirió desde el vector pENTR-QPT al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST (véase la figura 11A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-QPTox. Véase la figura 11D.

35

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

**[0209]** El vector pA622-QPTox se transformó en la cepa ERA10S de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

40

*Análisis de alcaloides*

**[0210]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete A622-GUS. Véase la figura 14.

45

**EJEMPLO 12: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor TobRD2**

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT*

**[0211]** La ORF de QPT se transfirió desde el vector pDONR221-QPT al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pTobRD2pro-QPTox. Véase la figura 11E.

55

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

60

**[0212]** El vector pTobRD2-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

65 *Análisis de alcaloides*

**[0213]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS.

5 Véase la figura 15.

### **EJEMPLO 13: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de *PMT* y *QPT* bajo el control del promotor de *A622***

#### 10 *Descripción de pBI221-A622pro-DEST*

**[0214]** pBI221-A622pro-DEST fue el vector básico para la construcción del vector binario de expresión multigénica. El promotor de *A622* de 1.407 pb se amplificó con el uso del vector pUC19-A622profull-LUC como molde y los cebadores específicos del promotor de *A622* y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBI221 (Clontech), con lo que se substituyó el promotor CaMV35S por el  
15 promotor de *A622*. El vector se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector, lo que substituyó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. Después se insertó un adaptador *HindIII-EcoRI* en el sitio *EcoRI* en el extremo 3' del  
20 terminador Nos, lo que dio lugar a pBI221-A622pro-DEST.

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT-QPT**

**[0215]** Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas *PMT* y *QPT*, las casetes de expresión *A622pro-PMT* y *A622pro-QPT* se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-A622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-A622pro-PMT. pBI221-A622pro-PMT se digirió con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor de *A622* del vector pA622pro-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pA622pro-PMTox-QPTox. En la figura 11F se muestra un diagrama  
30 de la región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox.

#### *Producción de plantas transgénicas de tabaco*

**[0216]** El vector pA622pro-PMTox-QPTox se transformó en la cepa ERA10S de *Agrobacterium tumefaciens*,  
35 que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[0217]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transformadas con pA622pro-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete *A622-GUS*. Véase la figura 16.

45

### **EJEMPLO 14: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de *PMT* y *QPT* bajo el control del promotor TobRD2**

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT-QPT**

50

**[0218]** Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas *PMT* y *QPT* bajo el control de TobRD2, las casetes de expresión TobRD2-PMT y TobRD2-QPT se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-TobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-TobRD2-PMT. El vector pBI221-TobRD2-PMT  
55 se digirió con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pTobRD2-PMTox-QPTox. Véase la figura 11G.

#### *Producción de plantas transgénicas de tabaco*

**[0219]** El vector pTobRD2-PMTox-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*,  
60 que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

65

**[0220]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe

anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con TobRD2-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, plantas K326 naturales transformadas con una casete TobRD2-GUS. Véase la figura 17.

5

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 15: producción de alcaloides nicotínicos en *Arabidopsis* mediante la expresión de *NBB1* en combinación con enzimas de la biosíntesis de alcaloides adicionales**

**[0221]** Las plantas de *Arabidopsis* no producen alcaloides nicotínicos. Sin embargo, un precursor de numerosos alcaloides nicotínicos, el ácido nicotínico, es un metabolito común. Se estudió el efecto de la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* en *Arabidopsis*. Dado que la nicotina es un alcaloide de especial interés, se incluyó la expresión de *PMT* para aumentar la disponibilidad de metilputrescina, un precursor del anillo de pirrolidina en la nicotina.

#### **15 Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *A622***

**[0222]** El ADNc de *A622* de tabaco que contenía un sitio *NcoI* introducido en el primer ATG (Hibi y col., 1994) se escindió de pcDNAII (Invitrogen) como fragmento *NcoI-BamHI* y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador doble. Esta casete para la sobreexpresión de *A622* se escindió con *HindIII* y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de *A622* pGA-A622.

#### *Producción de plantas transgénicas para 35S-A622*

**[0223]** El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Wassilewskija (WS)) con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inducción de callo y regeneración de plantas descrito básicamente por Akama y col., Plant Cell Reports 12: 7-11 (1992). Como marcador de selección para la transformación con pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (50 mg/l en medio de inducción de brotes). A partir del callo se regeneraron plantas transgénicas, que se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática.

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *NBB1* y *PMT**

**[0224]** La ORF de *NBB1* (SEQ ID NO: 1B) se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pGWB2 (véase la figura 18A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen, en el que *NBB1* está unido al promotor CaMV35S, se denominó p35S-NBB1. Véase la figura 18B. De manera similar, la ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT a pGWB2, mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denomina p35S-PMT. Véase la figura 18C.

#### **40 Producción de plantas transgénicas para 35S-A622-35S-NBB1, para 35S-A622-35S-PMT y para 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT**

**[0225]** Los vectores binarios p35S-NBB1 y p35S-PMT se introdujeron por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Las plantas de la generación T1 que contenían pGA-A622 se transformaron con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inmersión floral, básicamente según describen Clough y col., Plant J. 16: 735-43 (1998). Como marcador de selección para la transformación con p35S-NBB1 y p35S-PMT se usó la resistencia a higromicina (25 mg/l en medio de inducción de brotes). Las plantas transgénicas se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática. Las plantas transgénicas resultantes se identificaron por PCR genómica con los cebadores del promotor 35S y cebadores específicos de los genes *NBB1* y *PMT*.

#### *Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-NBB1*

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG

NBB1-1140 5' TGAGCCCAAGCTGTTTCAGAATCC

55

#### *Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-PMT*

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG

PMT-01R 5' CGCTAAACTCTGAAAACCCAGC

**[0226]** Las plantas positivas para 35S-A622-35S-NBB1 y las plantas positivas para 35S-A622-35S-PMT se cruzaron para producir plantas con 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT. La descendencia F1 se analizó por PCR genómica con el par de cebadores específico de cada casete de expresión.

**[0227]** De las líneas positivas por PCR se extrajeron las proteínas totales. La raíces congeladas se homogeneizaron inmediatamente en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ditiotreitól 200 mM mediante un mortero y mano. Después de la

centrifugación de los homogeneizados, las proteínas solubles en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. El análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo con suero de ratón dirigido contra A622 para la detección de la proteína A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1 para la detección de la proteína NBB1, según se describe en Shoji y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002). Se obtuvieron líneas transgénicas de expresión que contenían los dos polipéptidos A622 y NBB1. Véase la figura 19.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[0228]** Se seleccionaron líneas transgénicas que expresaban *NBB1* y *A622* y se usaron para el análisis de alcaloides. Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Como se muestra en la figura 20, se encontró un nuevo pico correspondiente al tiempo de elución de la nicotina en la línea *NBB1-A622-PTM*, pero no en la línea *A622-PTM*. Esto demuestra que la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* es más eficaz que la expresión de solo *A622* para la producción de alcaloides nicotínicos en una planta que normalmente no produce alcaloides.

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 16: expresión de *NBB1* y *A622* en células no vegetales**

**[0229]** El sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) de células de insectos y baculovirus se usó para expresar las proteínas *NBB1* y *A622* con una etiqueta 6x-His en células de insectos. Con el fin de construir el clon de expresión, las ORF de *NBB1* y *A622* (SEQ ID NO: 1B y 3B, respectivamente) se transfirieron desde los vectores DONR respectivos (pDONR-*NBB1*-2, pDONR-*A622*) al vector de GATEWAY pDEST10 (Invitrogen) mediante reacciones LR. Los clones de expresión resultantes se denominaron pDEST10-*NBB1* y pDEST10-*A622*.

**[0230]** pDEST10-*NBB1* y pDEST10-*A622* se transformaron en células MAX Efficiency DH10Bac (Invitrogen) para recuperar el ADN de los bácmidos recombinantes. Para verificar la presencia de los bácmidos recombinantes con *A622* y *NBB1* se usó un análisis de PCR con un cebador específico de los genes y un cebador inverso de M13. Véase la figura 21A.

**[0231]** Los bácmidos recombinantes resultantes que contenían las casetes de expresión de los genes respectivos se transfectaron en las células de insectos Sf9 con Cellfectin (Invitrogen). Las células Sf9 se infectaron con los cultivos de virus en dos tandas para amplificar y aumentar la producción de los virus.

**[0232]** *NBB1* y *A622* se produjeron en los cultivos de las células de insectos, según muestra la inmunotransferencia con los antisueros dirigidos contra *NBB1* y *A622*. Las proteínas recombinantes que contenían la etiqueta de 6x-His se purificaron por adsorción en columnas de Ni-NTA, seguida de elución con imidazol 0,5 M. Véase la figura 21B.

#### **[0233]**

#### **40 Cláusulas:**

Cláusula 1. Un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta de *Nicotiana* que comprende sobreexpresar al menos uno de *A622* y *NBB1* con respecto a una planta de control.

45 Cláusula 2. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *A622*.

Cláusula 3. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *NBB1*.

Cláusula 4. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresan *A622* y *NBB1*.

50 Cláusula 5. El procedimiento según la cláusula 4, que comprende además sobreexpresar al menos uno de *QPT* y *PMT*.

Cláusula 6. El procedimiento según la cláusula 5, en el que se sobreexpresan *QPT* y *A622*.

55 Cláusula 7. Planta con mayor nicotina producida mediante cualquiera de los procedimientos según las cláusulas 1-5.

Cláusula 8. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 7.

60 Cláusula 9. Producto según la cláusula 8, en el que dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

Cláusula 10. Procedimiento para producir alcaloides nicotínicos, que comprende expresar *NBB1* y *A622* de manera heteróloga en una planta o célula que de otro modo no producen alcaloides nicotínicos.

65 Cláusula 11. Procedimiento según la cláusula 10, en el que la expresión de *NBB1* y *A622* tiene lugar en una célula

seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentoso, alga, mamífero e insecto.

Cláusula 12. Planta con mayor cantidad de alcaloides nicotínicos producida mediante el procedimiento según la cláusula 10.

Cláusula 13. Producto alcaloide nicotínico producido mediante el procedimiento según la cláusula 10.

Cláusula 14. Procedimiento para producir un alcaloide nicotínico, que comprende (a) disponer de una pluralidad de células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide nicotínico de dicha pluralidad.

Cláusula 15. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta, que comprende sobreexpresar *PMT* y *QPT* en relación con una planta de control.

Cláusula 16. Planta con mayor nicotina producida mediante el procedimiento de la cláusula 15.

Cláusula 17. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 15.

Cláusula 18. Procedimiento de producción de la enzima *NBB1*, que comprende transformar una célula con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y crecer la célula transformada en condiciones de manera que se produce la enzima *NBB1*.

Cláusula 19. Procedimiento según la cláusula 18, en el que la célula transformada se selecciona del grupo que consiste en células de bacterias, levadura, hongo filamentoso, alga, plantas verdes y mamíferos.

Cláusula 20. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que comprende:

- (a) cruzar una planta de *Nicotiana* con mayor nicotina con una planta de *Nicotiana* con mayor rendimiento; y
- (b) seleccionar la planta progenie con una mayor nicotina y un mayor rendimiento.

Cláusula 21. Procedimiento según la cláusula 20, en el que dicha planta con mayor nicotina se produce mediante:

- (a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina;
- (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
- (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una planta de control.

Cláusula 22. Procedimiento según la cláusula 21, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

Cláusula 23. Planta con mayor nicotina y rendimiento producida mediante el procedimiento según la cláusula 20.

Cláusula 24. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que comprende:

- (a) transformar una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa el rendimiento;
- (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
- (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina y un mayor rendimiento en relación con una planta de control.

Cláusula 25. Procedimiento según la cláusula 24, en el que dicha primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica una enzima selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

Cláusula 26. Procedimiento para incrementar la nicotina en *N. tabacum*, que comprende sobreexpresar *PMT* en relación con una planta de control.



Listado de secuencias

[0234]

SEQ ID NO: 1

(polinucleótido *NBB1*)

ACGCGGGGAGAAATACATACAACATGTTTCCGCTCATAATTCTGATCAGCTT  
 TTCACTTGCTTCCTTGTCTGAAACTGCTACTGGAGCTGTTACAAATCTTTCAG  
 CCTGCTTAATCAACCACAATGTCCATAACTTCTCTATTTACCCCAAGTAG  
 AAATTACTTTAACTTGCTCCACTTCTCCCTTCAAAATCTTCGCTTTGCTGCAC  
 CTTTCATGCCGAAACCAACCTTCATTATCCTACCAAGCAGTAAGGAGGAGC  
 TCGTGAGCACCATTTTTTGTTCAGAAAAGCATCTTATGAAATCAGAGTAAG  
 GTGCGGCGGACACAGTTACGAAGGAACCTTCTTACGTTTCCTTTGACGCTTCT  
 CCATTCGTGATCGTTGACTTGATGAAATTAGACGACGTTTCAGTAGATTG  
 ATTCTGAAACAGCTTGGGCTCAGGGCGGCGCAACAATTGGCCAAATTTATT  
 ATGCCATTGCCAAGGTAAGTGACGTTTCATGCATTTTCAGCAGGTTTCGGGACC  
 AACAGTAGGATCTGGAGGTCATATTTTCAGGTGGTGGATTGGAATTTTATCT  
 AGAAAATTCGGACTTGCTGCTGATAATGTCGTTGATGCTCTTCTTATTGATG  
 CTGATGGACGGTTATTAGACCGAAAAGCCATGGGCGAAGACGTGTTTTGGG  
 CAATCAGAGGTGGCGGCGGTGGAAATTGGGGCATTGTTTATGCCTGGAAAA  
 TTCGATTACTCAAAGTGCCTAAAATCGTAACAACCTTGTATGATCTATAGGCC  
 TGGATCCAAACAATACGTGGCTCAAATACTTGAGAAATGGCAAATAGTTAC  
 TCCAAATTTGGTCGATGATTTTACTCTAGGAGTACTGCTGAGACCTGCAGAT  
 CTACCCGCGGATATGAAATATGGTAATACTACTCCTATTGAAATATTTCCCC  
 AATTCAATGCACTTTATTTGGGTCCAAAAACTGAAGTTCTTTCCATATCGAA  
 TGAGACATTTCCGGAGCTAGGCGTTAAGAATGATGAGTGCAAGGAAATGAC  
 TTGGGTAGAGTCAGCACTTTTCTTCTCCGAATTAGCTGACGTTAACGGGAAC  
 TCGACTGGTGATATCTCCCGTCTGAAAGAACGTTACATGGACGGAAAAGGT  
 TTTTTCAAAGGCAAAACGGAACGCTGGAAGAAGCCAGTTTCAATGGATGGG  
 ATGCTAACATTTCTTGTGGAACCTCGAGAAAAACCCGAAGGGATATCTTGTCT  
 TTGATCCTTATGGCGGAGCCATGGACAAGATTAGTGATCAAGCTATTGCTTT  
 CCCTCATAGAAAAGGTAACCTTTTCGCGATTTCAGTATCTAGCACAGTGGAAT  
 GAAGAGGACGATTACATGAGCGACGTTTACATGGAGTGGATAAGAGGATTT  
 TACAATACAATGACGCCCTTTGTTTCAAGCTCGCCAAGGGGAGCTTATATCA  
 ACTACTTGGATATGGATCTTGGAGTGAATATGGTCGACGACTACTTATTGCG  
 AAATGCTAGTAGCAGTAGTCCTTCTTCTCTGTTGATGCTGTGGAGAGAGCT  
 AGAGCGTGGGGTGAGATGTATTTCTTGCATAACTATGATAGGTTGGTTAAA  
 GCTAAGACACAAATTGATCCACTAAATGTTTTTCGACATGAACAGAGTATTC  
 CTCCTATGCTTGGTTCAACGCAAGAGCACAAGTATAGCAGTGAATGAGATT  
 TAAAATGTACTACCTTGAGAGAGATTCCGTTGTTAGTTTTCC

SEQ ID NO: 1B

(secuencia ORF de *NBB1* usada para la construcción de vectores)

ATGTTTCCGCTCATAATTCTGATCAGCTTTTCACTTGCTTCCTTGTCTGAAAC  
 TGCTACTGGAGCTGTTACAAATCTTTCAGCCTGCTTAATCAACCACAATGTC  
 CATAACTTCTCTATTTACCCACAAAGTAGAAATTACTTTAACTTGCTCCACTT  
 CTCCCTTCAAAAATCTTCGCTTTGCTGCACCTTTCATGCCGAAACCAACCTTC  
 ATTATCCTACCAAGCAGTAAGGAGGAGCTCGTGAGCACCATTTTTTGTGCA  
 GAAAAGCATCTTATGAAATCAGAGTAAGGTGCGGCGGACACAGTTACGAA  
 GGAACCTTCTTACGTTTCCTTTGACGCTTCTCCATTTCGTGATCGTTGACTTGAT  
 GAAATTAGACGACGTTTCAGTAGATTTGGATTCTGAAACAGCTTGGGCTCA  
 GGGCGGGCGCAACAATTGGCCAAATTTATTATGCCATTGCCAAGGTAAGTGA  
 CGTTCATGCATTTTCAGCAGGTTTCGGGACCAACAGTAGGATCTGGAGGTCA  
 TATTTTCAGGTGGTGGATTTGGACTTTTATCTAGAAAATTCGGACTTGCTGCT  
 GATAATGTCGTTGATGCTCTTCTTATTGATGCTGATGGACGGTTATTAGACC  
 GAAAAGCCATGGGCGAAGACGTGTTTTGGGCAATCAGAGGTGGCGGCGGT  
 GGAAATTGGGGCATTGTTTATGCCTGGAAAATTCGATTACTCAAAGTGCCTA  
 AAATCGTAACAACCTTGTATGATCTATAGGCCTGGATCCAAACAATACGTGG  
 CTCAAATACTTGAGAAATGGCAAATAGTTACTCCAAATTTGGTCGATGATTT  
 TACTCTAGGAGTACTGCTGAGACCTGCAGATCTACCCGCGGATATGAAATA  
 TGGTAATACTACTCCTATTGAAATATTTCCCAATTCAATGCACTTTATTTGG  
 GTCCAAAAACTGAAGTTCTTTCATATCGAATGAGACATTTCCGGAGCTAG  
 GCGTTAAGAATGATGAGTGCAAGGAAATGACTTGGGTAGAGTCAGCACTTT  
 TCTTCTCCGAATTAGCTGACGTTAACGGGAACTCGACTGGTGATATCTCCCG  
 TCTGAAAGAACGTTACATGGACGGAAAAGGTTTTTTCAAAGGCAAAACGGA  
 CTACGTGAAGAAGCCAGTTTCAATGGATGGGATGCTAACATTTCTTGTGGA  
 ACTCGAGAAAAACCCGAAGGGATATCTTGTCTTTGATCCTTATGGCGGAGC  
 CATGGACAAGATTAGTGATCAAGCTATTGCTTTCCTCATAGAAAAGGTAA  
 CCTTTTCGCGATTACAGTATCTAGCACAGTGGAATGAAGAGGACGATTACAT  
 GAGCGACGTTTACATGGAGTGGATAAGAGGATTTTACAATACAATGACGCC  
 CTTTGTTCAGCTCGCCAAGGGGAGCTTATATCAACTACTTGGATATGGAT  
 CTTGGAGTGAATATGGTCGACGACTACTTATTGCGAAATGCTAGTAGCAGT  
 AGTCCTTCTTCTCTGTTGATGCTGTGGAGAGAGCTAGAGCGTGGGGTGAG  
 ATGTATTTCTTGCATAACTATGATAGGTTGGTTAAAGCTAAGACACAAATTG  
 ATCCACTAAATGTTTTTCGACATGAACAGAGTATTCCTCCTATGCTTGGTTC  
 AACGCAAGAGCACAAAGTATAGCAGTGAATGA

5

SEQ ID NO: 2

(polipéptido NBB1)

MFPLIILISFSLASLSETATGAVTNLSACLINHNHNFHSIYPTSRNYFNLLHFSLQN  
 LRFAAPFMPKPTFIILPSSKEELVSTIFCCRKASYEIRVRCGGHSEYEGTSYVSFDA  
 SPFVIVDLMKLDDVSVDLSETAWAQGGATIGQIYYAIAKVSDVHAFSAGSGP  
 TVGSGGHISGGGFGLLSRKFLAADNVVDALLIDADGRLLDRKAMGEDVFWAI  
 RGGGGGNWGVYAWKIRLLKVPKIVTTCMIYRPGSKQYVAQILEKWQIVTPNL  
 VDDFTLGVLLRPADLPADMKYGNTPPIEIFPQFNALYLGPKTEVLSISNETFPEL  
 GVKNDECKEMTWVESALFFSELADVNGNSTGDISRLKERYMDGKGFFKGKTD  
 YVKKPVSMDGMLTFLVELEKNPKGYLVFDPYGGAMDKISDQAIAPHRKGNL  
 FAIQYLAQWNEEDDYMSDVYMEWIRGFYNTMTFPVSSSPRGAYINYLDMDLG  
 VNMVDDYLLRNASSSSPSSSVDAVERARAWGEMYFLHNYDRLVKAKTQIDPL  
 NVFRHEQSIPPMLGSTQEHKYSSE

5

SEQ ID NO: 3

(polinucleótido A622)

10

AAAAATCCGATTTAATTCCTAGTTTCTAGCCCCCTCCACCTTAACCCGAAGCT  
 ACTTTTTTTTCTTCCCCTAGGAGTAAAATGGTTGTATCAGAGAAAAGCAAGAT  
 CTTAATAATTGGAGGCACAGGCTACATAGGAAAATACTTGGTGGAGACAAG  
 TGCAAAATCTGGGCATCCAACTTTCGCTCTTATCAGAGAAAGCACACTCAA  
 AAACCCCGAGAAATCAAACTCATCGACACATTCAAGAGTTATGGGGTTAC  
 GCTACTTTTTGGAGATATATCCAATCAAGAGAGCTTACTCAAGGCAATCAA  
 GCAAGTTGATGTGGTGATTTCCACTGTCTGGAGGACAGCAATTTACTGATCA  
 AGTGAACATCATCAAAGCAATTAAAGAAGCTGGAAATATCAAGAGATTTCT  
 TCCTTCAGAATTTGGATTTGATGTGGATCATGCTCGTGCAATTGAACCAGCT  
 GCATCACTCTTCGCTCTAAAGGTAAGAATCAGGAGGATGATAGAGGCAGAA  
 GGAATTCCATACACATATGTAATCTGCAATTGGTTTGCAGATTTCTTCTTGC  
 CCAACTTGGGGCAGTTAGAGGCCAAAACCCCTCCTAGAGACAAAGTTGTCA  
 TTTTTGGCGATGGAAATCCCAAAGCAATATATGTGAAGGAAGAAGACATAG  
 CGACATACACTATCGAAGCAGTAGATGATCCACGGACATTGAATAAGACTC  
 TTCACATGAGACCACCTGCCAATATTCTATCCTTCAACGAGATAGTGTCTT  
 GTGGGAGGACAAAATTGGGAAGACCCTCGAGAAGTTATATCTATCAGAGGA  
 AGATATTCTCCAGATTGTACAAGAGGGACCTCTGCCATTAAGGACTAATTTG  
 GCCATATGCCATTCAGTTTTTGTTAATGGAGATTCTGCAAACTTTGAGGTTT  
 AGCCTCCTACAGGTGTCTGAAGCCACTGAGCTATATCCAAAAGTGAAATACA  
 CAACCGTCGACGAGTTCTACAACAAATTTGTCTAGTTTGTCTGATATCAATCT  
 GCGGTGACTCTATCAAACCTTGTTGTTTCTATGAATCTATTGAGTGTAATTGC  
 AATAATTTTCGCTTCAGTGCTTTTGCAACTGAAATGTACTAGCTAGTTGAAC  
 GCTAGCTAAATTCCTTACTGTTGTTTCTATTTTTCGTCTTATTTCCA

SEQ ID NO: 3B

(secuencia ORF de A622 usada para la construcción de vectores)

ATGGTTGTATCAGAGAAAAGCAAGATCTTAATAATTGGAGGCACAGGCTAC  
 ATAGGAAAATACTTGGTGGAGACAAGTGCAAAATCTGGGCATCCAACCTTC  
 GCTCTTATCAGAGAAAGCACACTCAAAAACCCCGAGAAATCAAAACTCATC  
 GACACATTCAAGAGTTATGGGGTTACGCTACTTTTTGGAGATATATCCAATC  
 AAGAGAGCTTACTCAAGGCAATCAAGCAAGTTGATGTGGTGATTTCCTG  
 TCGGAGGACAGCAATTTACTGATCAAGTGAACATCATCAAAGCAATTAAAG  
 AAGCTGGAAATATCAAGAGATTTCTTCCTTCAGAATTTGGATTTGATGTGGA  
 TCATGCTCGTGCAATTGAACCAGCTGCATCACTCTTCGCTCTAAAGGTAAGA  
 ATCAGGAGGATGATAGAGGCAGAAGGAATTCCATACACATATGTAATCTGC  
 AATTGGTTTGCAGATTTCTTCTTGCCCAACTTGGGGCAGTTAGAGGCCAAAA  
 CCCCTCCTAGAGACAAAGTTGTCATTTTTGGCGATGGAAATCCCAAAGCAA  
 TATATGTGAAGGAAGAAGACATAGCGACATACACTATCGAAGCAGTAGATG  
 ATCCACGGACATTGAATAAGACTCTTCACATGAGACCACCTGCCAATATTCT  
 ATCCTTCAACGAGATAGTGTCTTGTGGGAGGACAAAATTGGGAAGACCCT  
 CGAGAAGTTATATCTATCAGAGGAAGATAATTCTCCAGATTGTACAAGAGGG  
 ACCTCTGCCATTAAGGACTAATTTGGCCATATGCCATTCAGTTTTTGTTAAT  
 GGAGATTCTGCAAACTTTGAGGTTACGCTCCTACAGGTGTGAAGCCACT  
 GAGCTATATCCAAAAGTGAAATACACAACCGTCGACGAGTTCTACAACAAA  
 TTTGTCTAG

5

SEQ ID NO: 4

(polipéptido A622)

MVVSEKSKILIIGGTGYIGKYLVETSAKSGHPTFALIRESTLKNPEKSKLIDTFKS  
 YGVTLFLGDISNQESLLKAIKQVDVVISTVGGQQFTDQVNIHAIKEAGNIKRFL  
 PSEFGFDVDHARAIEPAASLFALKVRIRRMIEAEGIPYTYVICNWFADFFLPNLG  
 QLEAKTPPRDKVVIFGDGNPKAIYVKEEDIATYTHAVDDPRTLNLKTLHMRPPA  
 NILSFNEIVSLWEDKIGKTLEKLYLSEEDILQIVQEGPLPLRTNLAICHSVFVNGD  
 SANFEVQPPTGVEATELYPKVKYTTVDEFYNKFV

10



SEQ ID NO: 5

(polinucleótido QPT)

CAAAAACCTATTTTCCACAAAATTCATTTTACAACCCCCCAAAAAAAAAAACCC  
ATGTTTAGAGCTATTCCTTTCACTGCTACAGTGCATCCTTATGCAATTACAG  
CTCCAAGGTTGGTGGTGAAAATGTCAGCAATAGCCACCAAGAATACAAGAG  
TGGAGTCATTAGAGGTGAAACCACCAGCACACCCAACCTTATGATTTAAAGG  
AAGTTATGAACTTGCACTCTCTGAAGATGCTGGGAATTTAGGAGATGTGA  
CTTGTAAGGCGACAATTCCTCTTGATATGGAATCCGATGCTCATTCTTAGC  
AAAGGAAGACGGGATCATAGCAGGAATTGCACTTGCTGAGATGATATTTCGC  
GGAAGTTGATCCTTCATTAAAGGTGGAGTGGTATGTAAATGATGGCGATAA  
AGTTCATAAAGGCTTGAAATTTGGCAAAGTACAAGGAAACGCTTACAACAT  
TGTTATAGCTGAGAGGGTTGTTCTCAATTTTATGCAAAGAATGAGTGGAATA  
GCTACACTAACTAAGGAAATGGCAGATGCTGCACACCCTGCTTACATCTTG  
GAGACTAGGAAAACCTGCTCCTGGATTACGTTTGGTGGATAAATGGGCGGTA  
TTGATCGGTGGGGGGAAGAATCACAGAATGGGCTTATTTGATATGGTAATG  
ATAAAAGACAATCACATATCTGCTGCTGGAGGTGTCGGCAAAGCTCTAAAA  
TCTGTGGATCAGTATTTGGAGCAAAATAAACTTCAAATAGGGGTTGAGGTT  
GAAACCAGGACAATTGAAGAAGTACGTGAGGTTCTAGACTATGCATCTCAA  
ACAAAGACTTCGTTGACTAGGATAATGCTGGACAATATGGTTGTTCCATTAT  
CTAACGGAGATATTGATGTATCCATGCTTAAGGAGGCTGTAGAATTGATCA  
ATGGGAGGTTTGATACGGAGGCTTCAGGAAATGTTACCCTTGAAACAGTAC  
ACAAGATTGGACAAACTGGTGTACCTACATTTCTAGTGGTGGCCTGACGCA  
TTCCGTGAAAGCACTTGACATTTCCCTGAAGATCGATACAGAGCTCGCCCTT  
GAAGTTGGAAGGCGTACAAAACGAGCATGAGCGCCATTACTTCTGCTATAG  
GGTTGGAGTAAAAGCAGCTGAATAGCTGAAAGGTGCAAATAAGAATCATTT  
TACTAGTTGTCAAACAAAAGATCCTTCACTGTGTAATCAAACAAAAGATG  
TAAATTGCTGGAATATCTCAGATGGCTCTTTTCCAACCTTATTGCTTGAGTT  
GGTAATTTTATTATAGCTTTGTTTTTCATGTTTCATGGAATTTGTTACAATGAA  
AATACTTGATTATAAGTTTGGTGTATGTAAAATTCTGTGTTACTTCAAATA  
TTTTGAGATGTT

5

SEQ ID NO: 5B

(secuencia ORF de *QPT* usada para la construcción de vectores)

ATGTTTAGAGCTATTCCTTTCTACTGCTACAGTGCATCCTTATGCAATTACAG  
CTCCAAGGTTGGTGGTGAAAATGTGAGCAATAGCCACCAAGAATACAAGAG  
TGGAGTCATTAGAGGTGAAACCACCAGCACACCCAACTTATGATTTAAAGG  
AAGTTATGAACTTGCCTCTCTGAAGATGCTGGGAATTTAGGAGATGTGA  
CTTGTAAGGCGACAATTCCTCTTGATATGGAATCCGATGCTCATTTTCTAGC  
AAAGGAAGACGGGATCATAGCAGGAATTGCACTTGCTGAGATGATATTCGC  
GGAAGTTGATCCTTCATTAAAGGTGGAGTGGTATGTAAATGATGGCGATAA  
AGTTCATAAAGGCTTGAAATTTGGCAAAGTACAAGGAAACGCTTACAACAT  
TGTTATAGCTGAGAGGGTTGTTCTCAATTTTATGCAAAGAATGAGTGGAATA  
GCTACACTAACTAAGGAAATGGCAGATGCTGCACACCCTGCTTACATCTTG  
GAGACTAGGAAAACCTGCTCCTGGATTACGTTTGGTGGATAAATGGGCGGTA  
TTGATCGGTGGGGGGAAGAATCACAGAATGGGCTTATTTGATATGGTAATG  
ATAAAAGACAATCACATATCTGCTGCTGGAGGTGTCGGCAAAGCTCTAAAA  
TCTGTGGATCAGTATTTGGAGCAAAATAAACTTCAAATAGGGGTTGAGGTT  
GAAACCAGGACAATTGAAGAAGTACGTGAGGTTCTAGACTATGCATCTCAA  
ACAAAGACTTCGTTGACTAGGATAATGCTGGACAATATGGTTGTTCCATTAT  
CTAACGGAGATATTGATGTATCCATGCTTAAGGAGGCTGTAGAATTGATCA  
ATGGGAGGTTTGATACGGAGGCTTCAGGAAATGTTACCCTTGAAACAGTAC  
ACAAGATTGGACAACTGGTGTACCTACATTTCTAGTGGTGCCTTGACGCA  
TTCCGTGAAAGCACTTGACATTTCCCTGAAGATCGATACAGAGCTCGCCCTT  
GAAGATGGAAGGCGTACAAAACGAGCATGA

5

SEQ ID NO: 6

(polipéptido *QPT*)

10

MFRAIPFTATVHPYAITAPRLVVKMSAIAITKNTRVESLEVKPPAHPTYDLKEVM  
KLALSEDAGNLGDVTCKATIPLDMESDAHFLAKEDGIIAGIALAEMIFAEVDP  
SLKVEWYVNDGDKVHKGLKFGKVQGNAYNIVIAERVVLNFMQRMSGIATLTKE  
MADAAHPAYILETRKTAPGLRLVDKWAVLIGGGKNHRMGLFDMVMIKDNHIS  
AAGGVGKALKSVDQYLEQNKLOIGVEVETRTEEVRVLDYASQTKTSLTRIM  
LDNMVVPLSNGDIDVSMLEAVELINGRFDTEASGNVTLETVHKIGQTGVTYIS  
SGALTHSVKALDISLKIDTELALEVGRRTKRA

SEQ ID NO: 7

(polinucleótido *PMT* - ADNc de longitud completa según se describe en NCBI n° D28506)

5 Hibi y col., Plant Cell (1994)

GGAAAATACAAACCATAATACTTTCTCTTCTTCAATTTGTTTAGTTTAATTTT  
GAAAATGGAAGTCATATCTACCAACACAAATGGCTCTACCATCTTCAAGAA  
TGGTGCCATTCCCATGAACGGCCACCAAAATGGCACTTCTGAACACCTCAA  
CGGCTACCAGAATGGCACTTCCAAACACCAAAACGGGCACCAGAATGGCAC  
TTTCGAACATCGGAACGGCCACCAGAATGGGACATCCGAACAACAGAACG  
GGACAATCAGCCATGACAATGGCAACGAGCTACTGGGAAGCTCCGACTCTA  
TTAAGCCTGGCTGGTTTTTCAGAGTTTAGCGCATTATGGCCAGGTGAAGCATT  
CTCACTTAAGGTTGAGAAGTTACTATTCCAGGGGAAGTCTGATTACCAAGA  
TGTCATGCTCTTTGAGTCAGCAACTTATGGGAAGGTTCTGACTTTGGATGGA  
GCAATTCAACATACAGAGAATGGTGGATTTCCATACACTGAAATGATTGTT  
CATCTACCACTTGGTTCCATCCCAAACCCAAAAAAGGTTTTGATCATCGGCG  
GAGGAATTGGTTTTACATTATTCGAAATGCTTCGTTATCCTTCAATCGAAAA  
AATTGACATTGTTGAGATCGATGACGTGGTAGTTGATGTATCCAGAAAATTT  
TTCCCTTATCTGGCAGCTAATTTTAACGATCCTCGTGTAACCCTAGTTCTCGG  
AGATGGAGCTGCATTTGTAAAGGCTGCACAAGCGGGATATTATGATGCTAT  
TATAGTGGACTCTTCTGATCCCATTTGGTCCAGCAAAAGATTTGTTTGAGAGG  
CCATTCTTTGAGGCAGTAGCCAAAGCCCTTAGGCCAGGAGGAGTTGTATGC  
ACACAGGCTGAAAGCATTGTTGGCTTCATATGCATATTATTAAGCAAATCATTG  
CTAACTGTCGTCAAGTCTTTAAGGGTTCTGTCAACTATGCTTGGACAACCGC  
TCCAACATATCCCACCGGTGTGATCGGTTATATGCTCTGCTCTACTGAAGGG  
CCAGAAGTTGACTTCAAGAATCCAGTAAATCCAATTGACAAAGAGACAAC  
CAAGTCAAGTCCAAATTAGGACCTCTCAAGTTCTACAACCTCTGATATTCACA  
AAGCAGCATTCATTTTACCATCTTTCGCCAGAAGTATGATCGAGTCTTAATC  
AAGTGAATAATGAACACTGGTAGTACAATCATTGGACCAAGATCGAGTCTT  
AATCAAGTGAATAAATAAGTGAAATGCGACGTATTGTAGGAGAATTCTGCA  
GTAATTATCATAATTTCCAATTCACAATCATTGTAAAATTCTTTCTCTGTGGT  
GTTTCGTACTTTAATATAAATTTTCTGCTGAAGTTTTGAATCG

SEQ ID NO: 7B

(secuencia ORF de *PMT* usada para la construcción de vectores)

ATGGAAGTCATATCTACCAACACAAATGGCTCTACCATCTTCAAGAATGGT  
GCCATTCCCATGAACGGCCACCAAAATGGCACTTCTGAACACCTCAACGGC  
TACCAGAATGGCACTTCCAAACACCAAAACGGGCACCAGAATGGCACTTTC  
GAACATCGGAACGGCCACCAGAATGGGACATCCGAACAACAGAACGGGAC  
AATCAGCCATGACAATGGCAACGAGCTACTGGGAAGCTCCGACTCTATTAA  
GCCTGGCTGGTTTTTCAGAGTTTAGCGCATTATGGCCAGGTGAAGCATTCTCA  
CTTAAGGTTGAGAAGTTACTATTCCAGGGGAAGTCTGATTACCAAGATGTC  
ATGCTCTTTGAGTCAGCAACTTATGGGAAGGTTCTGACTTTGGATGGAGCAA  
TTCAACATACAGAGAATGGTGGATTTCCATACACTGAAATGATTGTTTCATCT  
ACCACTTGGTTCCATCCCAAACCCAAAAAAGGTTTTGATCATCGGCGGAGG  
AATTGGTTTTACATTATTCGAAATGCTTCGTTATCCTTCAATCGAAAAAATT  
GACATTGTTGAGATCGATGACGTGGTAGTTGATGTATCCAGAAAATTTTTCC  
CTTATCTGGCAGCTAATTTTAACGATCCTCGTGTAACCCTAGTTCTCGGAGA  
TGGAGCTGCATTTGTAAAGGCTGCACAAGCGGGATATTATGATGCTATTAT  
AGTGGACTCTTCTGATCCCATTTGGTCCAGCAAAAGATTTGTTTGAGAGGCCA  
TTCTTTGAGGCAGTAGCCAAAGCCCTTAGGCCAGGAGGAGTTGTATGCACA  
CAGGCTGAAAGCATTTGGCTTCATATGCATATTATTAAGCAAATCATTGCTA  
ACTGTCGTCAAGTCTTTAAGGGTTCTGTCAACTATGCTTGGACAACCGCTCC  
AACATATCCCACCGGTGTGATCGGTTATATGCTCTGCTCTACTGAAGGGCCA  
GAAGTTGACTTCAAGAATCCAGTAAATCCAATTGACAAAGAGACAACCTCAA  
GTCAAGTCCAAATTAGGACCTCTCAAGTTCTACAACCTCTGATATTCACAAAG  
CAGCATTCATTTTACCATCTTTCGCCAGAAGTATGATCGAGTCTTAA

5

SEQ ID NO: 8

(polipéptido *PMT*)

10

MEVISTNTNGSTIFKNGAIPMNGHQNGTSEHLNGYQNGTSKHQNGHQNGTFEH  
RNGHQNGTSEQQNGTISHDNGNELLGSSDSIKPGWFSEFSALWPGEAFSLKVEK  
LLFQGKSDYQDVMLFESATYGVLTLDGAIQHTENGGFYTEMIVHLPLGSIPN  
PKKVLIIGGGIGFTLFEMLRYPSEIKIDIVEIDDVVVDVSRKFFPYLAANFNDPRV  
TLVLGDGAAFVKAAQAGYYDAIIVDSSDPIGPAKDLFERPFFEAVAKALRPGGV  
VCTQAESIWLHMHIIKQIIANCRQVFKGSVNYAWTTAPTYPYTGVIYMLCSTEG  
PEVDFKNPVNPIDKETTQVKS KLGPLKFYNSDIHKA AFILPSFARSMIES

LISTADO DE SECUENCIAS

15 [0235]

<110> 22<sup>nd</sup> Century Limited, LLC  
<120> Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos  
<130> P33628EP-D1-PCT  
20 <140> No asignado  
<141> 2006-09-13  
<150> EP06848676.0  
<151> 2006-09-13

25 <160> 33

<170> PatentIn version 3.5



<210> 1  
 <211> 1749  
 <212> ADN  
 5 <213> Nicotiana sp.

<400> 1  
 acgcgggggag aaatacatac aacatgtttc cgctcataat tctgatcagc ttttcacttg 60  
 cttccttgtc tgaaactgct actggagctg ttacaaatct ttcagcctgc ttaatcaacc 120  
 10 acaatgtcca taacttctct atttacccca caagtagaaa ttactttaac ttgctccact 180  
 tctcccttca aaatcttcgc tttgctgcac ctttcatgcc gaaaccaacc ttcattatcc 240  
 taccaagcag taaggaggag ctctgtgagca ccattttttg ttgcagaaaa gcattcttatg 300  
 aaatcagagt aaggtgcggc ggacacagtt acgaaggaac ttcttacggt tcctttgacg 360  
 cttctccatt cgtgatcgtt gacttgatga aattagacga cgtttcagta gatttggatt 420  
 15 ctgaaacagc ttgggctcag ggcggcgcaa caattggcca aatttattat gccattgccca 480  
 aggtaagtga cgttcatgca ttttcagcag gttcggggacc aacagtagga tctggagggtc 540  
 atatttcagg tgggtgattt ggacttttat ctgaaaaatt cggacttgct gctgataatg 600  
 tcgttgatgc tcttcttatt gatgctgatg gacggttatt agaccgaaaa gccatgggcg 660  
 aagacgtgtt ttgggcaatc agaggtggcg gcggtggaaa ttggggcatt gtttatgcct 720  
 20 ggaaaaattcg attactcaaa gtgcctaaaa tcgtaacaac ttgtatgatc tataggcctg 780  
 gatccaaaca atacgtggct caaatacttg agaaatggca aatagttact ccaaatttgg 840  
 tcgatgattt tactctagga gtactgctga gacctgcaga tctacccgcg gatatgaaat 900  
 atggtaatac tactcctatt gaaatatttc cccaattcaa tgcactttat ttgggtccaa 960  
 aaactgaagt tctttccata tcgaatgaga catttccgga gctaggcggtt aagaatgatg 1020  
 25 agtgcaagga aatgacttgg gtagagtcag cacttttctt ctccgaatta gctgacgtta 1080  
 acgggaactc gactgggtgat atctcccgtc tgaaagaacg ttacatggac ggaaaagggt 1140  
 ttttcaaagg caaaacggac tacgtgaaga agccagtttc aatggatggg atgctaacat 1200  
 ttcttgtgga actcgagaaa aacccgaagg gatatcttgt ctttgatcct tatggcggag 1260  
 ccattggacaa gattagtgat caagctattg ctttccctca tagaaaagggt aaccttttcg 1320  
 30 cgattcagta tctagcacag tggaaatgaag aggacgatta catgagcgac gtttacatgg 1380  
 agtggaataag aggattttac aatacaatga cgccctttgt ttcaagctcg ccaaggggag 1440  
 cttatatcaa ctacttggat atggatcttg gagtgaatat ggtagacgac tacttattgc 1500  
 gaaatgctag tagcagtagt ccttcttcct ctgttgatgc tgtggagaga gctagagcgt 1560  
 ggggtgagat gtatttcttg cataactatg ataggttggt taaagctaag acacaaattg 1620  
 35 atccactaaa tgtttttcga catgaacaga gtattcctcc tatgcttggg tcaacgcaag 1680  
 agcacaagta tagcagtga tgagatttaa aatgtactac cttgagagag attccggtgt 1740  
 tagttttcc 1749

<210> 2  
 40 <211> 559  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 2  
 45 Met Phe Pro Leu Ile Ile Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ala Ser Leu Ser  
 1 Glu Thr Ala Thr Gly Ala Val Thr Asn Leu Ser Ala Cys Leu Ile Asn  
 20 His Asn Val His Asn Phe Ser Ile Tyr Pro Thr Ser Arg Asn Tyr Phe  
 35 Asn Leu Leu His Phe Ser Leu Gln Asn Leu Arg Phe Ala Ala Pro Phe  
 50 Met Pro Lys Pro Thr Phe Ile Ile Leu Pro Ser Ser Lys Glu Glu Leu  
 55 Val Ser Thr Ile Phe Cys Cys Arg Lys Ala Ser Tyr Glu Ile Arg Val  
 70 Arg Cys Gly Gly His Ser Tyr Glu Gly Thr Ser Tyr Val Ser Phe Asp  
 85 Ala Ser Pro Phe Val Ile Val Asp Leu Met Lys Leu Asp Asp Val Ser  
 100 Val Asp Leu Asp Ser Glu Thr Ala Trp Ala Gln Gly Gly Ala Thr Ile  
 115 Gly Gln Ile Tyr Tyr Ala Ile Ala Lys Val Ser Asp Val His Ala Phe  
 130 Ser Ala Gly Ser Gly Pro Thr Val Gly Ser Gly Gly His Ile Ser Gly  
 145 Gly Gly Phe Gly Leu Leu Ser Arg Lys Phe Gly Leu Ala Ala Asp Asn  
 165 170 175

ES 2 748 823 T3

Val Val Asp 180 Leu Leu Ile Asp 185 Ala Asp Gly Arg Leu Leu Asp Arg  
 195 200 205  
 5 Lys Ala Met Gly Glu Asp Val Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 Gly Asn Trp Gly Ile Val Tyr Ala Trp Lys Ile Arg Leu Leu Lys Val  
 225 230 235 240  
 Pro Lys Ile Val Thr Thr Cys Met Ile Tyr Arg Pro Gly Ser Lys Gln  
 245 250 255  
 10 Tyr Val Ala Gln Ile Leu Glu Lys Trp Gln Ile Val Thr Pro Asn Leu  
 260 265 270  
 Val Asp Asp Phe Thr Leu Gly Val Leu Leu Arg Pro Ala Asp Leu Pro  
 275 280 285  
 15 Ala Asp Met Lys Tyr Gly Asn Thr Thr Pro Ile Glu Ile Phe Pro Gln  
 290 295 300  
 Phe Asn Ala Leu Tyr Leu Gly Pro Lys Thr Glu Val Leu Ser Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Thr Phe Pro Glu Leu Gly Val Lys Asn Asp Glu Cys Lys Glu  
 325 330 335  
 20 Met Thr Trp Val Glu Ser Ala Leu Phe Phe Ser Glu Leu Ala Asp Val  
 340 345 350  
 Asn Gly Asn Ser Thr Gly Asp Ile Ser Arg Leu Lys Glu Arg Tyr Met  
 355 360 365  
 25 Asp Gly Lys Gly Phe Phe Lys Gly Lys Thr Asp Tyr Val Lys Lys Pr  
 370 375 380  
 Val Ser Met Asp Gly Met Leu Thr Phe Leu Val Glu Leu Glu Lys Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Lys Gly Tyr Leu Val Phe Asp Pro Tyr Gly Gly Ala Met Asp Lys  
 405 410 415  
 30 Ile Ser Asp Gln Ala Ile Ala Phe Pro His Arg Lys Gly Asn Leu Phe  
 420 425 430  
 Ala Ile Gln Tyr Leu Ala Gln Trp Asn Glu Glu Asp Asp Tyr Met Ser  
 435 440 445  
 Asp Val Tyr Met Glu Trp Ile Arg Gly Phe Tyr Asn Thr Met Thr Pro  
 450 455 460  
 35 Phe Val Ser Ser Ser Pro Arg Gly Ala Tyr Ile Asn Tyr Leu Asp Met  
 465 470 475 480  
 Asp Leu Gly Val Asn Met Val Asp Asp Tyr Leu Leu Arg Asn Ala Ser  
 485 490 495  
 40 Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Val Asp Ala Val Glu Arg Ala Arg Ala  
 500 505 510  
 Trp Gly Glu Met Tyr Phe Leu His Asn Tyr Asp Arg Leu Val Lys Ala  
 515 520 525  
 Lys Thr Gln Ile Asp Pro Leu Asn Val Phe Arg His Glu Gln Ser Ile  
 530 535 540  
 45 Pro Pro Met Leu Gly Ser Thr Gln Glu His Lys Tyr Ser Ser Glu  
 545 550 555

<210> 3  
 50 <211> 1179  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 3  
 55 aaaaatccga tttaattcct agtttctagc ccctccacct taacccgaag ctactttttt 60  
 tcttccccta ggagtaaaat ggttgatatca gagaaaagca agatcttaat aattggaggc 120  
 acaggctaca taggaaaata cttggtggag acaagtgcaa aatctgggca tccaactttc 180  
 gctcttatca gagaaagcac actcaaaaac cccgagaaat caaaactcat cgacacattc 240  
 aagagttatg gggttacgct acttttttga gatatatcca atcaagagag cttactcaag 300  
 60 gcaatcaagc aagttgatgt ggtgatttcc actgtcggag gacagcaatt tactgatcaa 360  
 gtgaacatca tcaaagcaat taaagaagct ggaaatatca agagatttct tccttcagaa 420  
 tttggatttg atgtggatca tgctcgtgca attgaaccag ctgcatcact cttcgtctta 480  
 aaggtaagaa tcaggaggat gatagaggca gaaggaattc catacacata tgtaatctgc 540  
 aattggtttg cagatttctt cttgcccac ttggggcagt tagaggccaa aaccctcct 600  
 65 agagacaaag ttgtcatttt tggcgaatga aatcccaaag caatatatgt gaaggaagaa 660  
 gacatagcga catacactat cgaagcagta gatgatccac ggacattgaa taagactctt 720  
 cacatgagac cacctgccaat tattctatcc ttcaacgaga tagtgtcctt gtgggaggac 780  
 aaaattggga agaccctcga gaagttatat ctatcagagg aagatattct ccagattgta 840

# ES 2 748 823 T3

caagagggac	ctctgccatt	aaggactaat	ttggccatat	gccattcagt	ttttgttaat	900
ggagattctg	caaactttga	ggttcagcct	cctacagggtg	tcgaagccac	tgagctatat	960
ccaaaagtga	aatacacaac	cgtcgacgag	ttctacaaca	aatttgtcta	gtttgtcgat	1020
atcaatctgc	ggtgactcta	tcaaacttgt	tgttttctatg	aatctattga	gtgtaattgc	1080
5 aataattttc	gcttcagtcg	ttttgcaact	gaaatgtact	agctagttga	acgctagcta	1140
aattcctttac	tgttgttttc	tatttttctg	cttattcca			1179

<210> 4  
 <211> 310  
 10 <212> PRT  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 4

15	Met	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Ser	Lys	Ile	Leu	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Gly
1	Tyr	Ile	Gly	Lys	Tyr	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Ala	Lys	Ser	Gly	His	Pro
	Thr	Phe	Ala	Leu	Ile	Arg	Glu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Lys	Ser
20	Lys	Leu	Ile	Asp	Thr	Phe	Lys	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Leu	Phe	Gly
	Asp	Ile	Ser	Asn	Gln	Glu	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Ile	Lys	Gln	Val	Asp
25	Val	Val	Ile	Ser	Thr	Val	Gly	Gly	Gln	Gln	Phe	Thr	Asp	Gln	Val	Asn
	Ile	Ile	Lys	Ala	Ile	Lys	Glu	Ala	Gly	Asn	Ile	Lys	Arg	Phe	Leu	Pro
	Ser	Glu	Phe	Gly	Phe	Asp	Val	Asp	His	Ala	Arg	Ala	Ile	Glu	Pro	Ala
30	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Leu	Lys	Val	Arg	Ile	Arg	Arg	Met	Ile	Glu	Ala
	Glu	Gly	Ile	Pro	Tyr	Thr	Tyr	Val	Ile	Cys	Asn	Trp	Phe	Ala	Asp	Phe
35	Phe	Leu	Pro	Asn	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Arg	Asp
	Lys	Val	Val	Ile	Phe	Gly	Asp	Gly	Asn	Pro	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Lys
	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Val	Asp	Asp	Pro	Arg
40	Thr	Leu	Asn	Lys	Thr	Leu	His	Met	Arg	Pro	Pro	Ala	Asn	Ile	Leu	Ser
	Phe	Asn	Glu	Ile	Val	Ser	Leu	Trp	Glu	Asp	Lys	Ile	Gly	Lys	Thr	Leu
45	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Ile	Leu	Gln	Ile	Val	Gln	Glu
	Gly	Pro	Leu	Pro	Leu	Arg	Thr	Asn	Leu	Ala	Ile	Cys	His	Ser	Val	Phe
	Val	Asn	Gly	Asp	Ser	Ala	Asn	Phe	Glu	Val	Gln	Pro	Pro	Thr	Gly	Val
50	Glu	Ala	Thr	Glu	Leu	Tyr	Pro	Lys	Val	Lys	Tyr	Thr	Thr	Val	Asp	Glu
	Phe	Tyr	Asn	Lys	Phe	Val										

<210> 5  
 <211> 1399  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 5

caaaaactat	tttccacaaa	attcattttca	caaccccccc	aaaaaaaaaac	catgttttaga	60
gctatttcctt	tcactgctac	agtgcatcct	tatgcaatta	cagctccaag	gttggtggtg	120
aaaatgtcag	caatagccac	caagaatata	agagtggagt	cattagagggt	gaaaccacca	180
65 gcacacccaa	cttatgattt	aaaggaagtt	atgaaacttg	cactctctga	agatgctggg	240
aatttaggag	atgtgacttg	taaggcgaca	attcctcttg	atatggaatc	cgatgctcat	300
tttctagcaa	aggaagacgg	gatcatagca	ggaattgcac	ttgctgagat	gatattcgcg	360

```

gaagttgatac cttcattaaa ggtggagtggt tatgtaaatg atggcgataa agttcataaa 420
ggcttgaaat ttggcaaagt acaaggaaac gcttacaaca ttgttatagc tgagagggtt 480
gttctcaatt ttatgcaaag aatgagtgga atagctacac taactaagga aatggcagat 540
gctgcacacc ctgcttacat cttggagact agggaaaactg ctcctggatt acgtttggtg 600
5 gataaatggg cgggtattgat cgggtggggg agaatacaca gaatgggctt atttgatatg 660
gtaatgataa aagacaatca catatctgct gctggagggtg tcggcaaagc tctaaaatct 720
gtggatcagt atttggagca aaataaactt caaatagggg ttgagggtga aaccaggaca 780
attgaagaag tacgtgaggt tctagactat gcatctcaaa caaagacttc gttgactagg 840
ataatgctgg acaatatggt tgttccatta tctaacggag atattgatgt atccatgctt 900
10 aaggaggctg tagaattgat caatgggagg tttgatacgg aggcttcagg aaatgttacc 960
cttgaacacag tacacaagat tggacaaact ggtgttacct acatttctag tggtgccctg 1020
acgcattccg tgaaagcact tgacatttcc ctgaagatcg atacagagct cgcccttgaa 1080
gttgaagcgt gtacaaaacg agcatgagcg ccattacttc tgctataggg ttggagtaaa 1140
agcagctgaa tagctgaaag gtgcaataaa gaatcatttt actagtgtgc aaacaaaaga 1200
15 tccttcactg tgtaatcaaa caaaaagatg taaattgctg gaatatctca gatggctctt 1260
ttccaacctt attgcttgag ttggtaattt cattatagct ttgttttcat gtttcatgga 1320
atttgttaca atgaaaatac ttgatttata agtttggtgt atgtaaaatt ctgtgttact 1380
tcaaatattt tgagatggt 1399

```

```

20 <210> 6
   <211> 351
   <212> PRT
   <213> Nicotiana sp.

```

```

25 <400> 6

```

```

Met Phe Arg Ala Ile Pro Phe Thr Ala Thr Val His Pro Tyr Ala Ile
1      5      10      15
Thr Ala Pro Arg Leu Val Val Lys Met Ser Ala Ile Ala Thr Lys Asn
30      20      25      30
Thr Arg Val Glu Ser Leu Glu Val Lys Pro Pro Ala His Pro Thr Tyr
      35      40      45
Asp Leu Lys Glu Val Met Lys Leu Ala Leu Ser Glu Asp Ala Gly Asn
50      55      60
35 Leu Gly Asp Val Thr Cys Lys Ala Thr Ile Pro Leu Asp Met Glu Ser
65      70      75      80
Asp Ala His Phe Leu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Ile Ala Gly Ile Ala
      85      90      95
Leu Ala Glu Met Ile Phe Ala Glu Val Asp Pro Ser Leu Lys Val Glu
40      100      105      110
Trp Tyr Val Asn Asp Gly Asp Lys Val His Lys Gly Leu Lys Phe Gly
      115      120      125
Lys Val Gln Gly Asn Ala Tyr Asn Ile Val Ile Ala Glu Arg Val Val
130      135      140
45 Leu Asn Phe Met Gln Arg Met Ser Gly Ile Ala Thr Leu Thr Lys Glu
145      150      155      160
Met Ala Asp Ala Ala His Pro Ala Tyr Ile Leu Glu Thr Arg Lys Thr
      165      170      175
Ala Pro Gly Leu Arg Leu Val Asp Lys Trp Ala Val Leu Ile Gly Gly
50      180      185      190
Gly Lys Asn His Arg Met Gly Leu Phe Asp Met Val Met Ile Lys Asp
195      200      205
Asn His Ile Ser Ala Ala Gly Gly Val Gly Lys Ala Leu Lys Ser Val
210      215      220
55 Asp Gln Tyr Leu Glu Gln Asn Lys Leu Gln Ile Gly Val Glu Val Glu
225      230      235      240
Thr Arg Thr Ile Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln
      245      250      255
Thr Lys Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro
60      260      265      270
Leu Ser Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu
      275      280      285
Leu Ile Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu
290      295      300
65 Glu Thr Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser
305      310      315      320
Gly Ala Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile

```

# ES 2 748 823 T3

Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala  
 340 325 330 335  
 345 350

5 <210> 7  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

10 <400> 7  
 ggaaaataca aaccataata ctttctcttc ttcaatttgt ttagtttaat tttgaaaatg 60  
 gaagtcatat ctaccaacac aaatggctct accatcttca agaatgggtgc cattcccatg 120  
 aacggccacc aaaatggcac ttctgaacac ctcaacggct accagaatgg cacttccaaa 180  
 caccaaaacg ggcaccagaa tggcactttc gaacatcgga acggccacca gaatgggaca 240  
 15 tccgaacaac agaacgggac aatcagccat gacaatggca acgagctact gggaagctcc 300  
 gactctatta agcctggctg gttttcagag tttagcgcat tatggccagg tgaagcattc 360  
 tcacttaagg ttgagaagtt actattccag gggaagtctg attaccaaga tgtcatgctc 420  
 tttgagtcag caacttatgg gaaggttctg actttggatg gagcaattca acatacagag 480  
 aatgggtggat ttccatacac tgaaatgatt gttcatctac cacttgggtc catcccaaac 540  
 20 ccaaaaaagg ttttgatcat cggcggagga attggtttta cattattcga aatgcttcgt 600  
 tatccttcaa tcgaaaaaat tgacattgtt gagatcgatg acgtggtagt tgatgtatcc 660  
 agaaaatttt tcccttatct ggcagctaatt tttaacgatc ctcgtgtaac cctagttctc 720  
 ggagatggag ctgcatttgg aaaggctgca caagcgggat attatgatgc tattatagtg 780  
 gactcttctg atcccattgg tccagcaaaa gatttgtttg agaggccatt ctttgaggca 840  
 25 gtatgcaaaag cccttaggcc aggaggagtt gtatgcacac aggtgaaag catttggctt 900  
 catatgcata ttattaagca aatcattgct aactgtcgtc aagtctttaa gggttctgtc 960  
 aactatgctt ggacaaccgc tccaacatat cccaccgggtg tgatcgggta tatgctctgc 1020  
 tctactgaag ggccagaagt tgacttcaag aatccagtaa atccaattga caaagagaca 1080  
 actcaagtca agtccaaatt aggacctctc aagttctaca actctgatat tcacaaagca 1140  
 30 gcatttcattt taccatcttt cgccagaagt atgatcgagt cttaatcaag tgaataatga 1200  
 acatgggtag tacaatcatt ggaccaagat cgagtcctaa tcaagtgaat aaataagtga 1260  
 aatgcgacgt attgtaggag aattctgcag taattatcat aattttcaat tcacaatcat 1320  
 tgtaaaattc ttttctctgt gtgtttcgta ctttaatata aattttcctg ctgaagtttt 1380  
 gaatcg 1386

35  
 <210> 8  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana sp.

40  
 <400> 8  
 Met Glu Val Ile Ser Thr Asn Thr Asn Gly Ser Thr Ile Phe Lys Asn  
 1 5 10 15  
 45 Gly Ala Ile Pro Met Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu His Leu  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Gln Asn Gly Thr Ser Lys His Gln Asn Gly His Gln Asn  
 35 40 45  
 Gly Thr Phe Glu His Arg Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu Gln  
 50 55 60  
 Gln Asn Gly Thr Ile Ser His Asp Asn Gly Asn Glu Leu Leu Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Ser Ile Lys Pro Gly Trp Phe Ser Glu Phe Ser Ala Leu Trp  
 85 90 95  
 55 Pro Gly Glu Ala Phe Ser Leu Lys Val Glu Lys Leu Leu Phe Gln Gly  
 100 105 110  
 Lys Ser Asp Tyr Gln Asp Val Met Leu Phe Glu Ser Ala Thr Tyr Gly  
 115 120 125  
 Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Ala Ile Gln His Thr Glu Asn Gly Gly  
 130 135 140  
 60 Phe Pro Tyr Thr Glu Met Ile Val His Leu Pro Leu Gly Ser Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Asn Pro Lys Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Ile Gly Phe Thr Leu  
 165 170 175  
 65 Phe Glu Met Leu Arg Tyr Pro Ser Ile Glu Lys Ile Asp Ile Val Glu  
 180 185 190  
 Ile Asp Asp Val Val Val Asp Val Ser Arg Lys Phe Phe Pro Tyr Leu

# ES 2 748 823 T3

		195				200				205				
	Ala	Ala	Asn	Phe	Asn	Asp	Pro	Arg	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Gly
		210					215					220		
5	Ala	Ala	Phe	Val	Lys	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ala
225						230					235			Ile
	Val	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Ile	Gly	Pro	Ala	Lys	Asp	Leu	Phe
					245					250				Glu
	Pro	Phe	Phe	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly
				260					265					Val
10	Cys	Thr	Gln	Ala	Glu	Ser	Ile	Trp	Leu	His	Met	His	Ile	Ile
			275					280					285	Lys
	Ile	Ile	Ala	Asn	Cys	Arg	Gln	Val	Phe	Lys	Gly	Ser	Val	Asn
		290					295					300		Tyr
	Trp	Thr	Thr	Ala	Pro	Thr	Tyr	Pro	Thr	Gly	Val	Ile	Gly	Tyr
15	305					310					315			Met
	Cys	Ser	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Phe	Lys	Asn	Pro	Val
					325					330				Asn
	Ile	Asp	Lys	Glu	Thr	Thr	Gln	Val	Lys	Ser	Lys	Leu	Gly	Pro
				340					345				350	Leu
20	Phe	Tyr	Asn	Ser	Asp	Ile	His	Lys	Ala	Ala	Phe	Ile	Leu	Pro
			355					360					365	Ser
	Ala	Arg	Ser	Met	Ile	Glu	Ser							Phe
		370					375							

25 <210> 9  
 <211> 1680  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

30 <400> 9  
 atgtttccgc tcataattct gatcagcttt tcacttgctt ccttgctctga aactgctact 60  
 ggagctgtta caaatctttc agcctgctta atcaaccaca atgtccataa cttctctatt 120  
 taccacacaa gtagaaatta ctttaacttg ctccacttct cccttcaaaa tcttcgcttt 180  
 gctgcacctt tcatgccgaa accaaccttc attatcctac caagcagtaa ggaggagctc 240  
 35 gtgagcacca ttttttggtg cagaaaagca tcttatgaaa tcagagtaag gtgcggcgga 300  
 cacagttacg aaggaacttc ttacgtttcc tttgacgctt ctccattcgt gatcgttgac 360  
 ttgatgaaat tagacgacgt ttcagtagat ttggattctg aaacagcttg ggctcagggc 420  
 ggcgcaacaa ttggccaaat ttattatgcc attgccaaag taagtgcatt tcatgcattt 480  
 tcagcaggtt cgggaccaac agtaggatct ggaggtcata tttcaggttg tggatttgga 540  
 40 cttttatcta gaaaattcgg acttgctgct gataatgtcg ttgatgctct tcttattgat 600  
 gctgatggac ggttattaga ccgaaaagcc atgggcgaag acgtgttttg ggcaatcaga 660  
 ggtggcgcg gtggaaattg gggcatttgt tatgcctgga aaattcgatt actcaaagtg 720  
 cctaaaaatc taacaacttg tatgatctat aggcctggat ccaaacaata cgtggctcaa 780  
 atacttgaga aatggcaaat agttactcca aatttggtcg atgattttac tctaggagta 840  
 45 ctgctgagac ctgcagatct acccgcggtat atgaaatatg gtaatactac tcctattgaa 900  
 atatttcccc aattcaatgc actttatttg ggtccaaaaa ctgaagtctt ttccatatcg 960  
 aatgagacat ttccggagct aggcgttaag aatgatgagt gcaaggaaat gacttgggta 1020  
 gagtcagcac ttttcttctc cgaattagct gacgttaacg ggaactcgac tgggtgatatc 1080  
 tcccgtctga aagaacgtta catggacgga aaaggttttt tcaaaggcaa aacggataac 1140  
 50 gtgagtagca cagtttcaat ggatgggatg ctaaatgttt ttgtggaact cgagaaaaac 1200  
 ccgaagggat atcttgctct tgatccttat ggcgagacca tggacaagat tagtgatcaa 1260  
 gctattgctt tccctcatag aaaaggtaac cttttcgaga ttcagtatct agcacagtgg 1320  
 aatgaagagg acgattacat gagcgacgtt tacatggagt ggataagagg attttacaat 1380  
 acaatgacgc cttttgtttc aagctcgcca aggggagctt atatcaacta cttggatatg 1440  
 55 gatcttgag tgaatatggt cgacgactac ttattgagaa atgctagtat cagttagtct 1500  
 tcttctctgt ttgatgctgt ggagagagct agagcgtggg gtgagatgta tttcttgcat 1560  
 aactatgata gggttggttaa agctaagaca caaattgatc cactaaatgt ttttcgacat 1620  
 gaacagagta ttctctctat gcttggttca acgcaagagc acaagtatag cagtgaatga 1680

60 <210> 10  
 <211> 933  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

65 <400> 10  
 atggttggtat cagagaaaag caagatctta ataattggag gcacaggcta cataggaaaa 60  
 tacttggttg agacaagtgc aaaatctggg catccaactt tcgctcttat cagagaaagc 120

	acactcaaaa	acccccgagaa	atcaaaaactc	atcgacacat	tcaagagtta	tgggggttacg	180
	ctactttttg	gagatatatc	caatcaagag	agcttactca	aggcaatcaa	gcaagttgat	240
	gtggtgattt	ccactgtcgg	aggacagcaa	tttactgatc	aagtgaacat	catcaaagca	300
	attaaagaag	ctggaaatat	caagagattt	cttccttcag	aatttggatt	tgatgtggat	360
5	catgctcgtg	caattgaacc	agctgcatca	ctcttcgctc	taaaggtaag	aatcaggagg	420
	atgatagagg	cagaaggaa	tccatacaca	tatgtaatct	gcaattgggt	tgagatttc	480
	ttcttgccca	acttggggca	gttagaggcc	aaaaccctc	ctagagacaa	agttgtcatt	540
	tttgccgatg	gaaatcccaa	agcaatatat	gtgaaggaa	aagacatagc	gacatacact	600
	atcgaagcag	tagatgatcc	acggacattg	aataagactc	ttcacatgag	accacctgcc	660
10	aatattctat	ccttcaacga	gatagtgtcc	ttgtggggagg	acaaaattgg	gaagaccctc	720
	gagaagttat	atctatcaga	ggaagatatt	ctccagattg	tacaagaggg	acctctgcca	780
	ttaaggacta	atttggccat	atgccattca	gtttttgtta	atggagattc	tgcaaacctt	840
	gaggttcagc	ctcctacagg	tgctgaagcc	actgagctat	atccaaaagt	gaaatacaca	900
	accgtcgacg	agttctacaa	caaatgtgtc	tag			933
15	<210> 11						
	<211> 1056						
	<212> ADN						
	<213> Nicotiana sp.						
20	<400> 11						
	atgttttagag	ctattccttt	caactgctaca	gtgcatcctt	atgcaattac	agctccaagg	60
	ttggtggtga	aaatgtcagc	aatagccacc	aagaatacaa	gagtgaggatc	attagagggtg	120
	aaaccaccag	cacacccaac	ttatgattta	aagggaagta	tgaaacttgc	actctctgaa	180
25	gatgctggga	attttaggaga	tgtagcttgt	aaggcgacaa	ttcctcttga	tatggaatcc	240
	gatgtctcatt	ttctagcaaa	ggaagacggg	atcatagcag	gaattgcact	tgctgagatg	300
	atattcgcgg	aagttgatcc	ttcattaaag	gtggagtggg	atgtaaatga	tgggcataaa	360
	gttcataaag	gcttgaaatt	tggcaaagta	caaggaaaacg	cttacaacat	tgttatagct	420
	gagagggttg	ttctcaattt	tatgcaaaga	atgagtggaa	tagctacact	aactaaggaa	480
30	atggcagatg	ctgcacaccc	tgcttacatc	ttggagacta	ggaaaactgc	tcctggatta	540
	cgtttgggtg	ataaatgggc	ggatttgatc	gggtgggggga	agaatcacag	aatgggctta	600
	tttgatatgg	taatgataaa	agacaatcac	atatctgctg	ctggagggtg	cggcaaagct	660
	ctaaaatctg	tggaatcagta	tttgagacaa	aataaacttc	aaataggggt	tgaggttgaa	720
	accaggacaa	ttgaagaagt	acgtgagggt	ctagactatg	catctcaaac	aaagacttcg	780
35	ttgactagga	taatgctgga	caatatgggt	gttccattat	ctaacggaga	tattgatgta	840
	tccatgtctta	aggaggctgt	agaattgatc	aatgggaggt	ttgatacggg	ggcttcagga	900
	aatgtttacc	ttgaaacagt	acacaagatt	ggacaaaactg	gtgttaccta	catttctagt	960
	ggtgcccctga	cgcattccgt	gaaagcactt	gacatttccc	tgaagatcga	tacagagctc	1020
	gcccttgaag	atggaaggcg	tacaaaacga	gcatga			1056
40	<210> 12						
	<211> 1128						
	<212> ADN						
	<213> Nicotiana sp.						
45	<400> 12						
	atggaagtca	tatctaccaa	cacaaatggc	tctaccatct	tcaagaatgg	tgccattccc	60
	atgaacggcc	acaaaaatgg	cacttctgaa	cacctcaacg	gctaccagaa	tggcacttcc	120
	aaacaccaaa	acgggcacca	gaatggcact	ttcgaacatc	ggaacggcca	ccagaatggg	180
50	acatccgaac	aacagaacgg	gacaatcagc	catgacaatg	gcaacgagct	actgggaagc	240
	tccgactcta	ttaaagcctgg	ctgggttttca	gagtttagcg	cattatggcc	agggtgaagca	300
	ttctcactta	aggttgagaa	gttactattc	caggggaagt	ctgattacca	agatgtcatg	360
	ctcttttagt	cagcaactta	tgggaagggt	ctgacttttg	atggagcaat	tcaacataca	420
	gagaatgggtg	gattttccata	cactgaaatg	attgttcatc	taccacttgg	ttccatccca	480
55	aacccaaaaa	aggttttgat	catcggcgga	ggaattgggt	ttacattatt	cgaaatgctt	540
	cgttatcctt	caatcgaaaa	aattgacatt	gttgagatcg	atgacgtggg	agttgatgta	600
	tccagaaaaa	ttttccctta	tctggcagct	aatttttaacg	atcctcgtgt	aaccctagtt	660
	ctcggagatg	gagctgcatt	tgtaaaggct	gcacaagcgg	gatattatga	tgctattata	720
	gtggactctt	ctgatcccat	tgggtccagca	aaagatttgt	ttgagaggcc	attctttgag	780
60	gcagtagcca	aagcccttag	gccaggagga	gttgatgca	cacaggctga	aagcatttgg	840
	cttcatatgc	atattattaa	gcaaatcatt	gctaactgtc	gtcaagtctt	taagggttct	900
	gtcaactatg	cttggacaac	cgctccaaca	tatcccaccg	gtgtgatcgg	ttatatgctc	960
	tgctctactg	aaggggccaga	agttgacttc	aagaatccag	taaatccaat	tgacaaagag	1020
	acaactcaag	tcaagtccaa	attaggacct	ctcaagttct	acaactctga	tattcacaaa	1080
65	gcagcattca	ttttaccatc	tttcgccaga	agtatgatcg	agtcttaa		1128
	<210> 13						

# ES 2 748 823 T3

<211> 538  
 <212> PRT  
 <213> Eschscholzia californica

5 <400> 13

10	Met	Glu	Asn	Lys	Thr	Pro	Ile	Phe	Phe	Ser	Leu	Ser	Ile	Phe	Leu	Ser	
	1				5					10					15		
15	Leu	Leu	Asn	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Asn	Asp	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	
				20					25					30			
20	Phe	Asn	Gly	Val	Arg	Asn	His	Thr	Val	Phe	Ser	Ala	Asp	Ser	Asp	Ser	
			35					40					45				
25	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	Leu	His	Leu	Ser	Ile	Gln	Asn	Pro	Leu	Phe	Gln	
		50					55					60					
30	Asn	Ser	Leu	Ile	Ser	Lys	Pro	Ser	Ala	Ile	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	
	65					70					75					80	
35	Glu	Glu	Leu	Ser	Asn	Thr	Ile	Arg	Cys	Ile	Arg	Lys	Gly	Ser	Trp	Thr	
					85					90					95		
40	Ile	Arg	Leu	Arg	Ser	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Glu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr	
				100					105					110			
45	Ser	Asp	Thr	Pro	Phe	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Met	Asn	Leu	Asn	Arg	Val	
			115					120					125				
50	Ser	Ile	Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Thr	Ala	Trp	Val	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	
		130					135					140					
55	Leu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Thr	Glu	Ser	Ser	Ser	Lys	Leu	Gly	
	145					150					155					160	
60																	
65																	



# ES 2 748 823 T3

	Phe	Thr	Ala	Gly	Trp	Cys	Pro	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Gly	His	Ile	Ser	
					165					170					175		
5	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	Met	Ser	Arg	Lys	Tyr	Gly	Leu	Ala	Ala	Asp	
				180					185					190			
	Asn	Val	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	Gly	Ala	Ile	Leu	Asp	
			195					200					205				
10	Arg	Gln	Ala	Met	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	
		210					215					220					
15	Gly	Gly	Val	Trp	Gly	Ala	Ile	Tyr	Ala	Trp	Lys	Ile	Lys	Leu	Leu	Pro	
	225					230					235					240	
	Val	Pro	Glu	Lys	Val	Thr	Val	Phe	Arg	Val	Thr	Lys	Asn	Val	Ala	Ile	
20					245					250					255		
	Asp	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	His	Lys	Trp	Gln	Phe	Val	Ala	Glu	Glu	
				260					265					270			
25	Leu	Glu	Glu	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp	Glu	Lys	
			275					280					285				
30	Gln	Val	Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Gly	Phe	His	Phe	Gly	Leu	Lys	Thr	Val	
		290					295					300					
	Ala	Lys	Ser	Thr	Phe	Asp	Leu	Leu	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Glu	
35		305				310					315					320	
	Glu	Asp	Tyr	Leu	Glu	Met	Ser	Trp	Gly	Glu	Ser	Phe	Ala	Tyr	Leu	Ala	
					325					330					335		
40	Gly	Leu	Glu	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Leu	Lys	Phe	Asp	
				340					345					350			
45	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Thr	Lys	Val	Asp	Leu	Thr	Lys	Glu	Pro	Leu	Pro	
			355					360					365				
	Ser	Lys	Ala	Phe	Tyr	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Pro	Asn	
50		370					375					380					
	Gly	Phe	Ile	Ala	Leu	Asn	Gly	Phe	Gly	Gly	Gln	Met	Ser	Lys	Ile	Ser	
	385					390					395					400	
55	Ser	Asp	Phe	Thr	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	
					405					410					415		
60																	
65																	

Glu Tyr Ile Val Ala Trp Asn Gln Ser Glu Gln Lys Lys Lys Thr Glu  
 420 425 430  
 5  
 Phe Leu Asp Trp Leu Glu Lys Val Tyr Glu Phe Met Lys Pro Phe Val  
 435 440 445  
 10  
 Ser Lys Asn Pro Arg Leu Gly Tyr Val Asn His Ile Asp Leu Asp Leu  
 450 455 460  
 15  
 Gly Gly Ile Asp Trp Gly Asn Lys Thr Val Val Asn Asn Ala Ile Glu  
 465 470 475 480  
 20  
 Ile Ser Arg Ser Trp Gly Glu Ser Tyr Phe Leu Ser Asn Tyr Glu Arg  
 485 490 495  
 25  
 Leu Ile Arg Ala Lys Thr Leu Ile Asp Pro Asn Asn Val Phe Asn His  
 500 505 510  
 30  
 Pro Gln Ser Ile Pro Pro Met Ala Asn Phe Asp Tyr Leu Glu Lys Thr  
 515 520 525  
 35  
 Leu Gly Ser Asp Gly Gly Glu Val Val Ile  
 530 535  
 40  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador sintético  
 <400> 14  
 50 ggaaaactaa caacggaatc tct 23  
  
 <210> 15  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador sintético  
 60  
 <400> 15  
 gatcaagcta ttgctttccc t 21  
 65  
 <210> 16  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223>	Cebador sintético	
	<400>	16	
5	aaaaagcagg	ctcacatgt ttccgctcat aattctg	37
	<210>	17	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador sintético	
15	<400>	17	
	agaaagctgg	gttcattcac tgctatactt gtgc	34
	<210>	18	
	<211>	29	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador sintético	
25	<400>	18	
	ggggacaagt	ttgtacaaaa aagcaggct	29
	<210>	19	
30	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
35	<223>	Cebador sintético	
	<400>	19	
	ggggaccact	ttgtacaaga aagctgggt	29
40	<210>	20	
	<211>	31	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador sintético	
	<400>	20	
	aaagcttgga	aacatattca atacattgta g	31
50	<210>	21	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
55	<220>		
	<223>	Cebador sintético	
	<400>	21	
60	tctagattct	actactatatt tataagtg	28
	<210>	22	
	<211>	51	
	<212>	ADN	
65	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador sintético	

	<400> 22 aaaaagcagg cttcgaagga gatagaacca tggttgtatc agagaaaagc a	51
5	<210> 23 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 23 agaaagctgg gtcctagaca aatttgttgt agaactcgtc g	41
15	<210> 24 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 24 aaaagcttag atctctctta tgtttcatg	29
30	<210> 25 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 25 tctagattta ctcttagggg aagaaaaaaa gtagc	35
40	<210> 26 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 26 aaaaagcagg ctcaaaaatg gaagtcatat c	31
50	<210> 27 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
55	<400> 27 agaaagctgg gtttaagact cgatcatact tc	32
60	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 28	

	caccatgttt agagctattc c	21
	<210> 29	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 29	
	tcatgctcgt tttgtacgcc	20
	<210> 30	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador sintético	
	<400> 30	
	acccttcctc tatataagga ag	22
25	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 31	
	tgagcccaag ctgtttcaga atcc	24
35	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 32	
45	acccttcctc tatataagga ag	22
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
55	<400> 33	
	cgctaaactc tgaaaaccag c	21

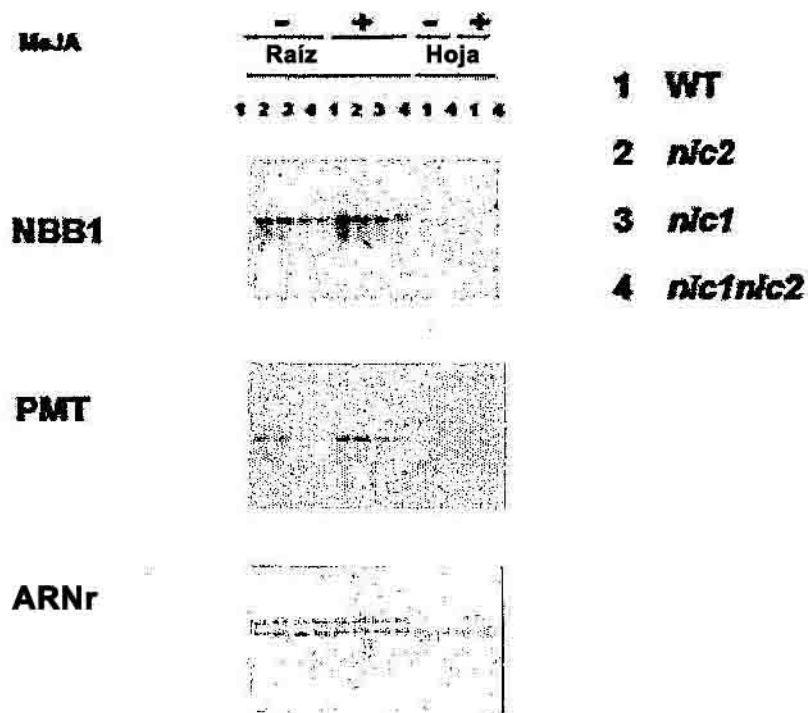
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, que comprende sobreexpresar el gen de A622 y el gen de NBB1 en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada, en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además sobreexpresar al menos uno de los genes de QPT y PMT, en el que el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
3. Planta de *Nicotiana* con mayor cantidad de nicotina que sobreexpresa el gen de A622 y el gen de NBB1 en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada, en la que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
4. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, que comprende:
  - (a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', (i) un primer promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; en el que el ácido nucleico es el gen de A622 y se sobreexpresa el gen de A622, y (ii) un segundo promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; en el que el ácido nucleico es el gen de NBB1 y se sobreexpresa el gen de NBB1;
  - (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
  - (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada;
 en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, que incrementa además el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, comprendiendo dicho procedimiento además transformar dicha planta de *Nicotiana* con: una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa el rendimiento; en el que dicha planta de *Nicotiana* transgénica también se selecciona basándose en el mayor rendimiento en relación con una planta de control de *Nicotiana* no transformada; en el que dicha construcción, tal como se define en la reivindicación 4, puede comprender también un gen de QPT y/o PMT en la dirección 5' a 3'; y en el que el gen de A622 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; el gen de NBB1 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4 o 5, que comprende además (d) sobreexpresar al menos uno de los genes de QPT y PMT, en el que el gen de QPT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5, o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y el gen de PMT comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7 o codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además la etapa de producir un producto con mayor nicotina a partir de dicha planta o célula, en el que el producto tiene un aumento de dos veces o más de nicotina en relación con un producto producido a partir de una planta no transformada de control, y en el que el producto tiene mayores niveles de A622 y mayores niveles de NBB1.
8. Planta de *Nicotiana*, según la reivindicación 3, que comprende una primera y una segunda construcción, tal como se definen en la reivindicación 5.
9. Procedimiento de producción de un producto con mayor nicotina utilizando una planta, tal como se define en la reivindicación 3 u 8, en el que el producto tiene un aumento de dos veces o más de nicotina en relación con un producto producido a partir de una planta no transformada de control, y en el que el producto tiene mayores niveles de A622 y mayores niveles de NBB1.
10. Procedimiento, según la reivindicación 7 o 9, en el que el producto se selecciona del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

11. Utilización de cualquiera de las plantas, según la reivindicación 3 u 8, para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

## Figura 1

### Análisis de transferencia de ARN de la expresión de NBB1

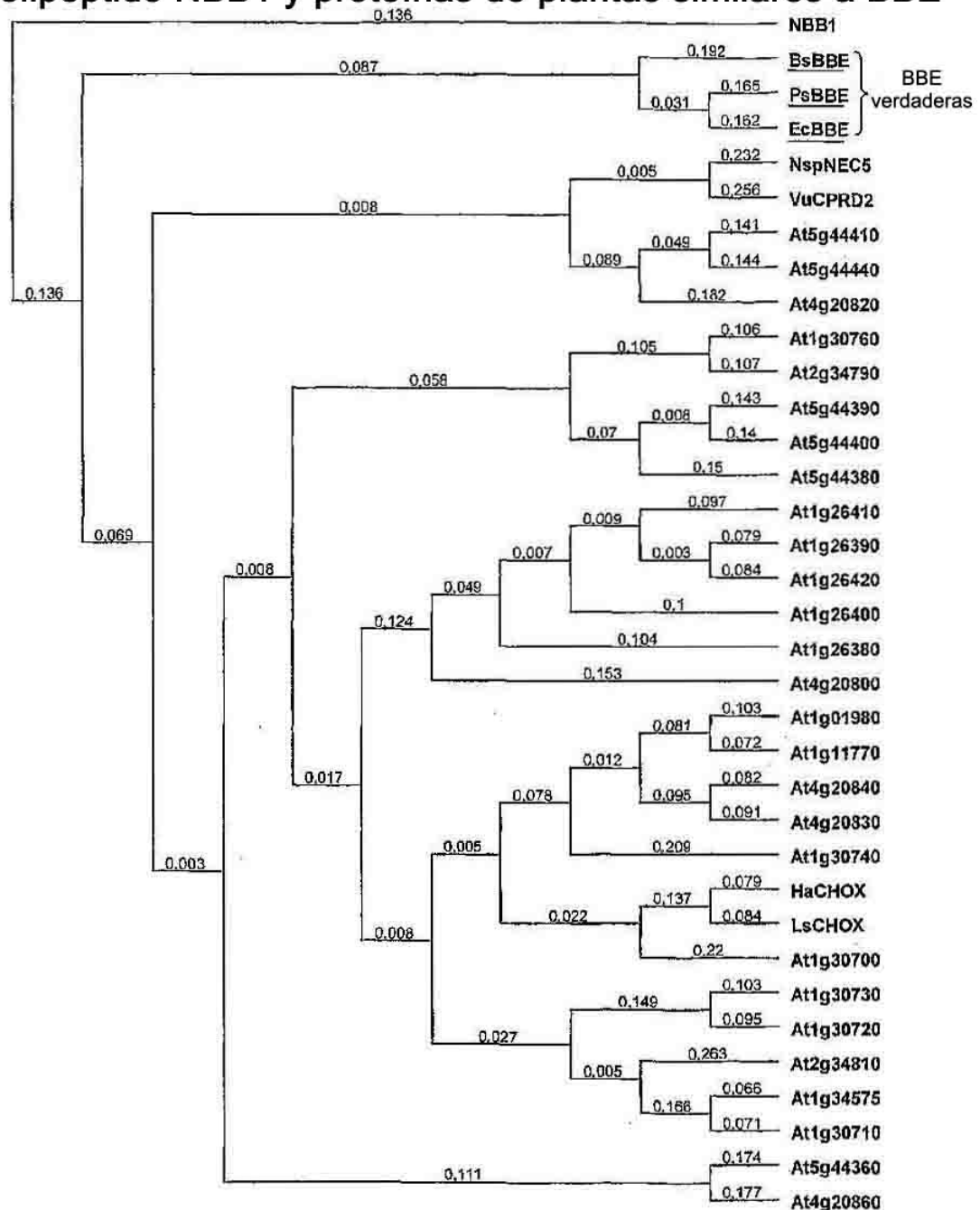






**Figura 3**

**Árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido NBB1 y proteínas de plantas similares a BBE**

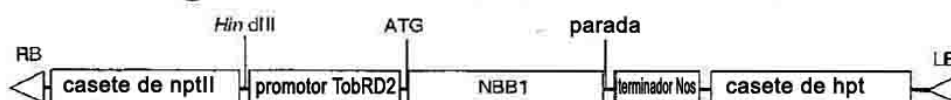


## Figuras 4A-4F

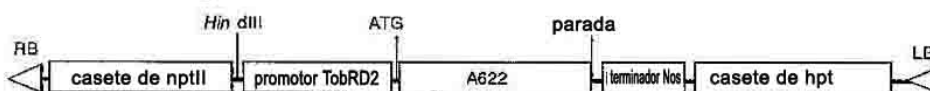
**Figura 4A** Región de ADN-T de pTobRD2-DEST



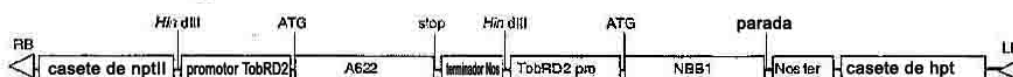
**Figura 4B** Región de ADN-T de pTobRD2-NBB1ox



**Figura 4C** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox



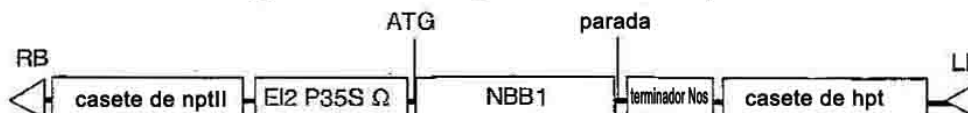
**Figura 4D** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox



**Figura 4E** Región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST

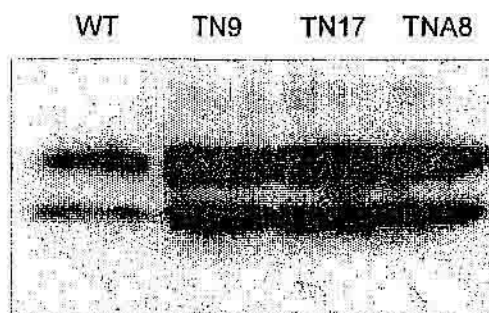


**Figura 4F** Región de ADN-T de pEI235SΩ-NBB1

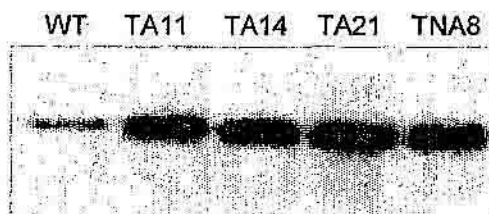


## Figuras 5A y 5B

**Figura 5A** Análisis de inmunotransferencia de NBB1

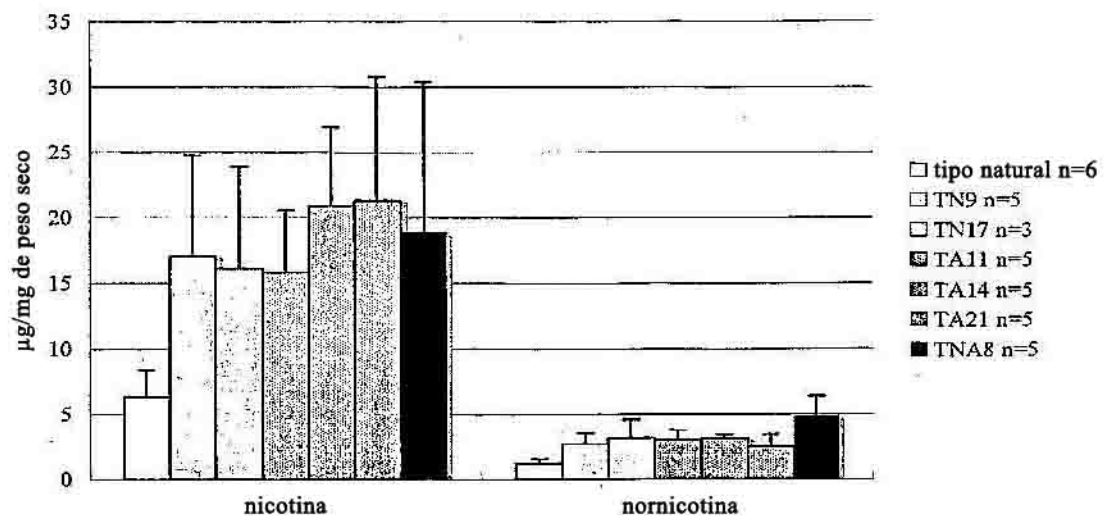


**Figura 5B** A622 en raíces capilares de tabaco



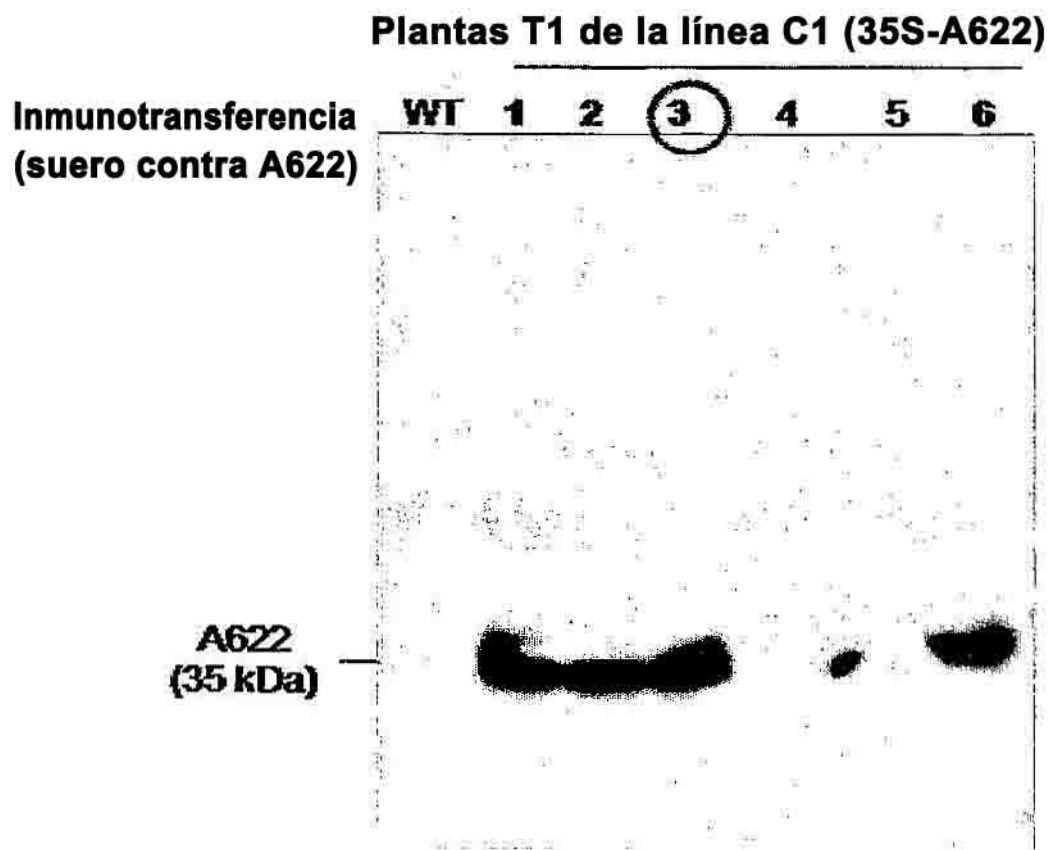
## Figura 6

Contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de TobRD2-NBB1 (TN), TobRD2-A622 (TA) y TobRD2-NBB1-A622 (TNA)



## Figura 7

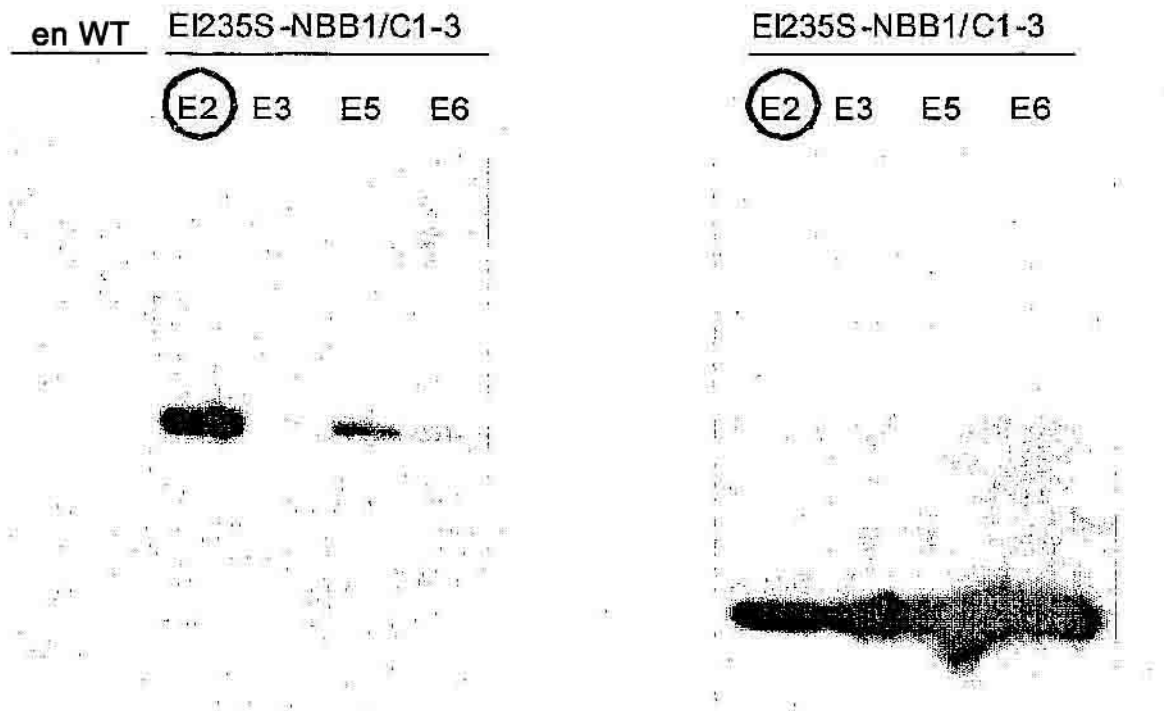
Expresión de la proteína A622 en plantas transgénicas de *A. belladonna*



## Figura 8

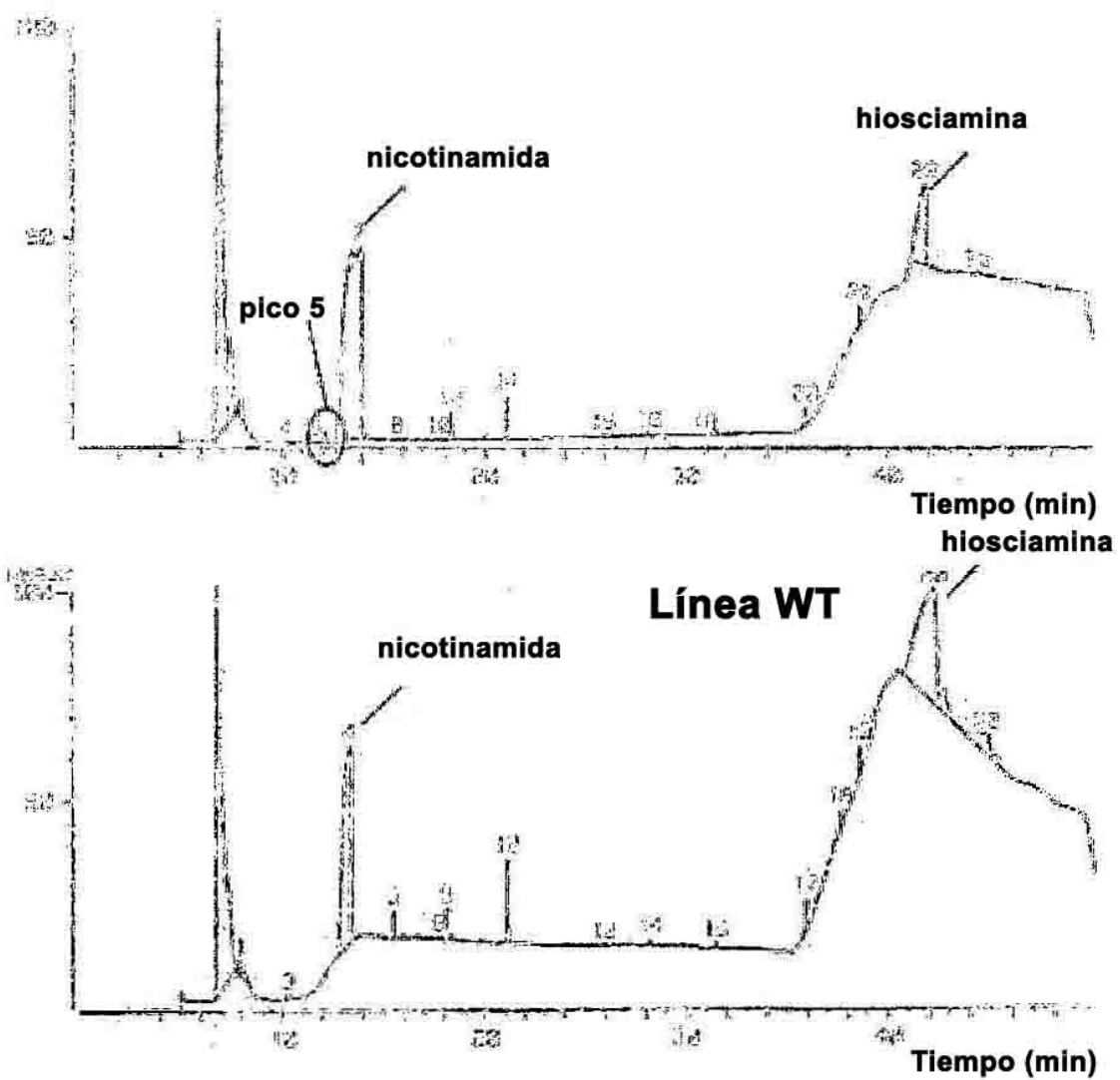
### Plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

Inmunotransferencia (suero contra NBB1 / A622)      Inmunotransferencia (suero contra NBB1 / A622)



## Figura 9

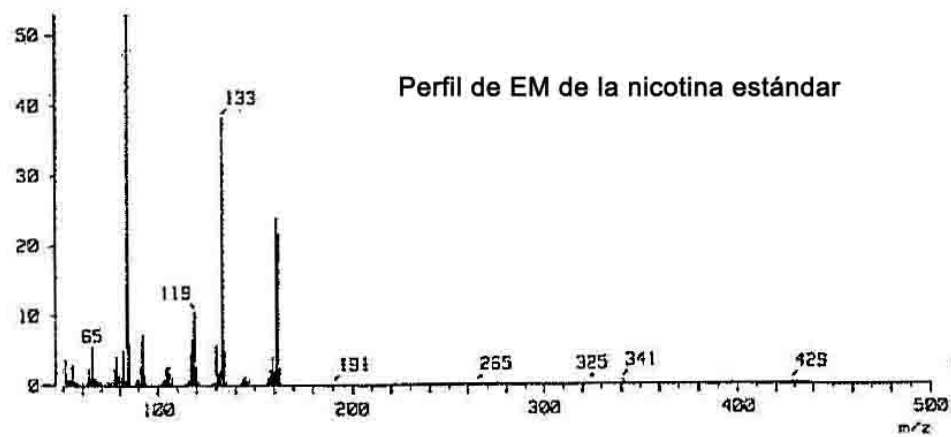
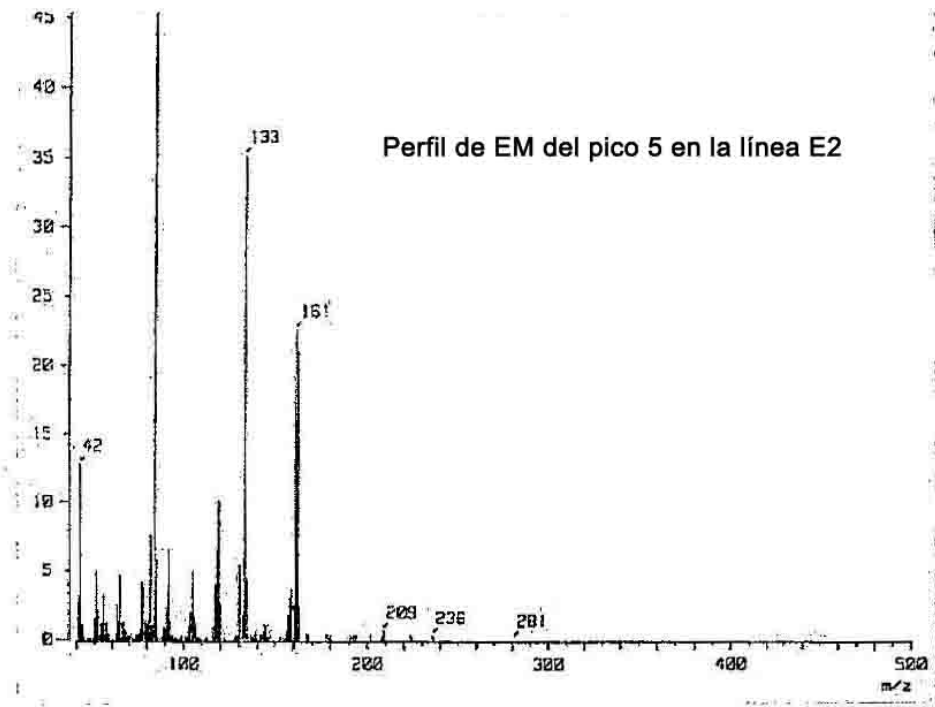
Síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622





## Figura 10

Perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

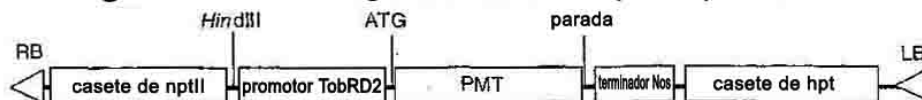


## Figuras 11A-11G

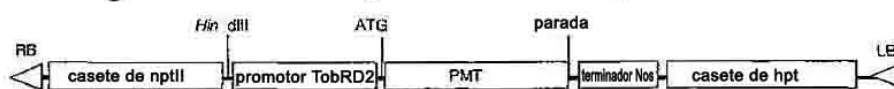
**Figuras 11A** Región de ADN-T de pA622pro-DEST



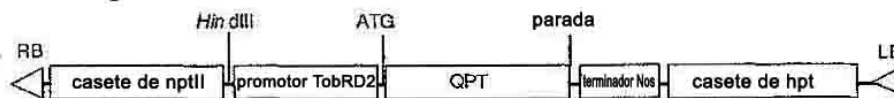
**Figuras 11B** Región de ADN-T de pA622pro-PMTox



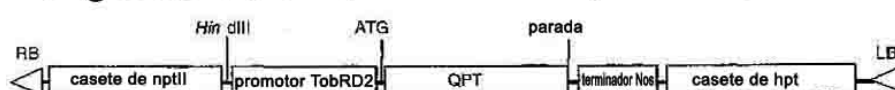
**Figuras 11C** Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox



**Figuras 11D** Región de ADN-T de pA622pro-QPTox



**Figuras 11E** Región de ADN-T de pTobRD2-QPTox



**Figuras 11F** Región de ADN-T de pA622proPMTox-QPTox

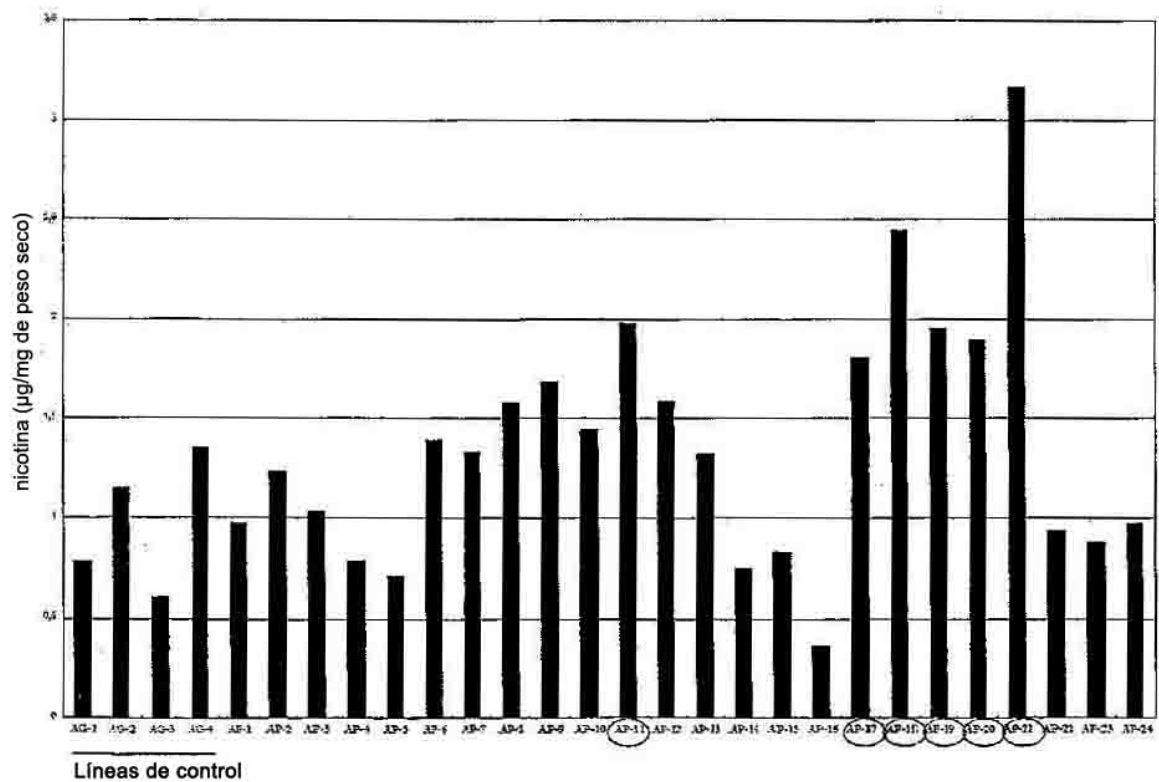


**Figuras 11G** Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox



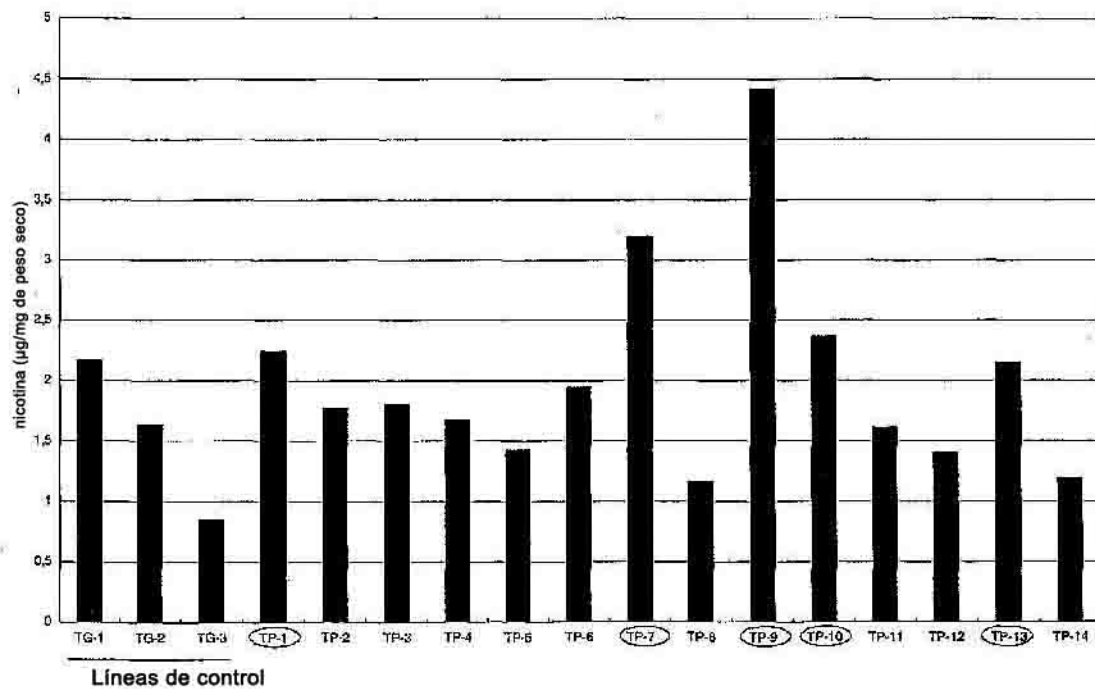
**Figura 12**

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS.



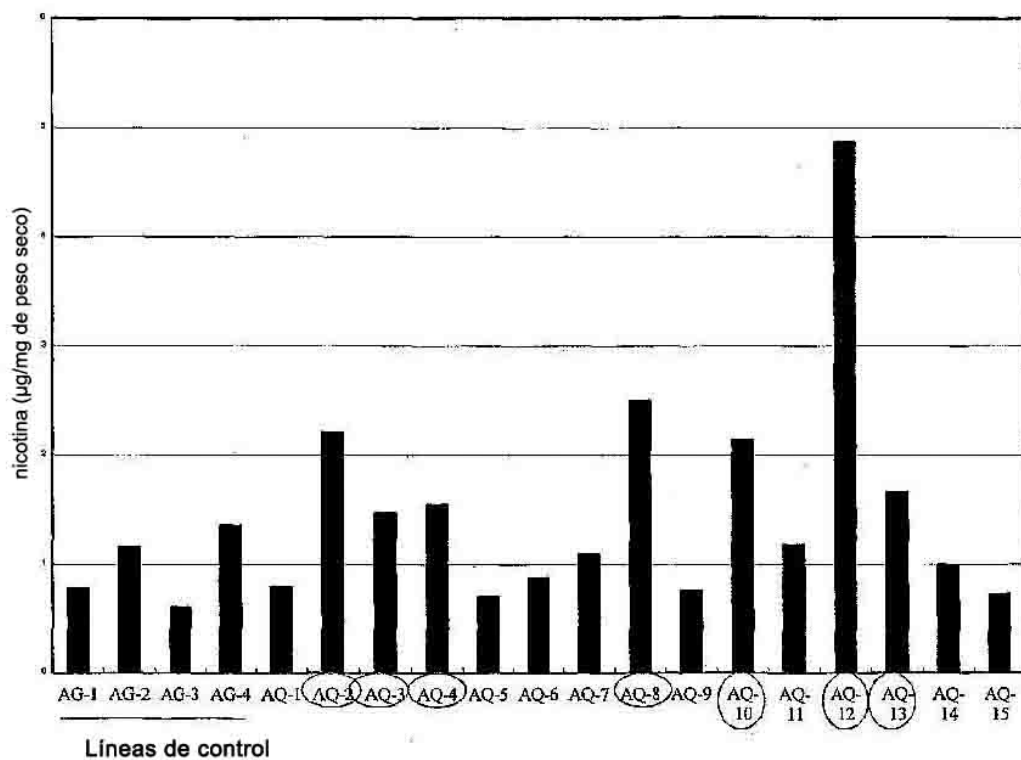
## Figura 13

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.



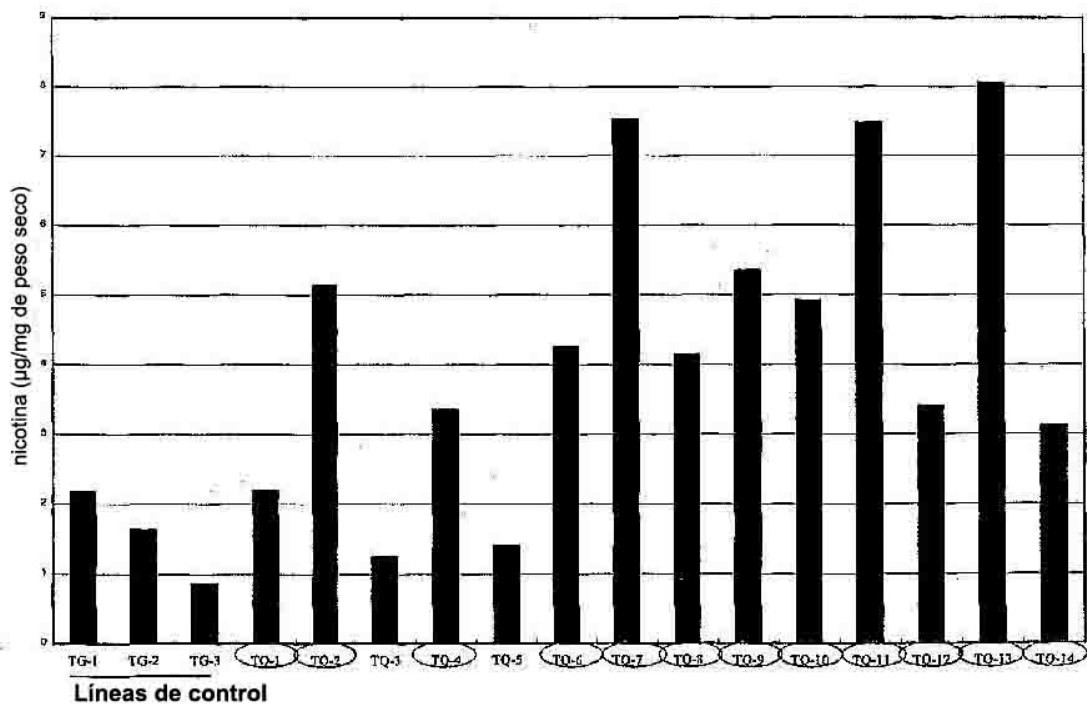
**Figura 14**

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS



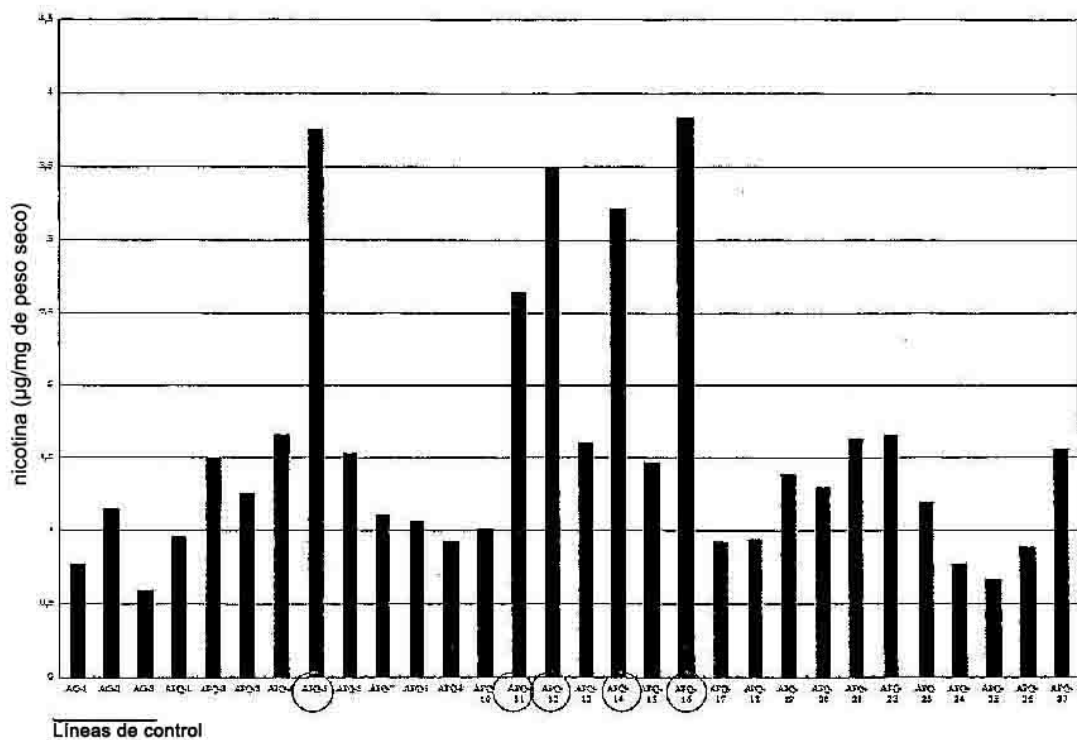
**Figura 15**

**Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS nicotina**



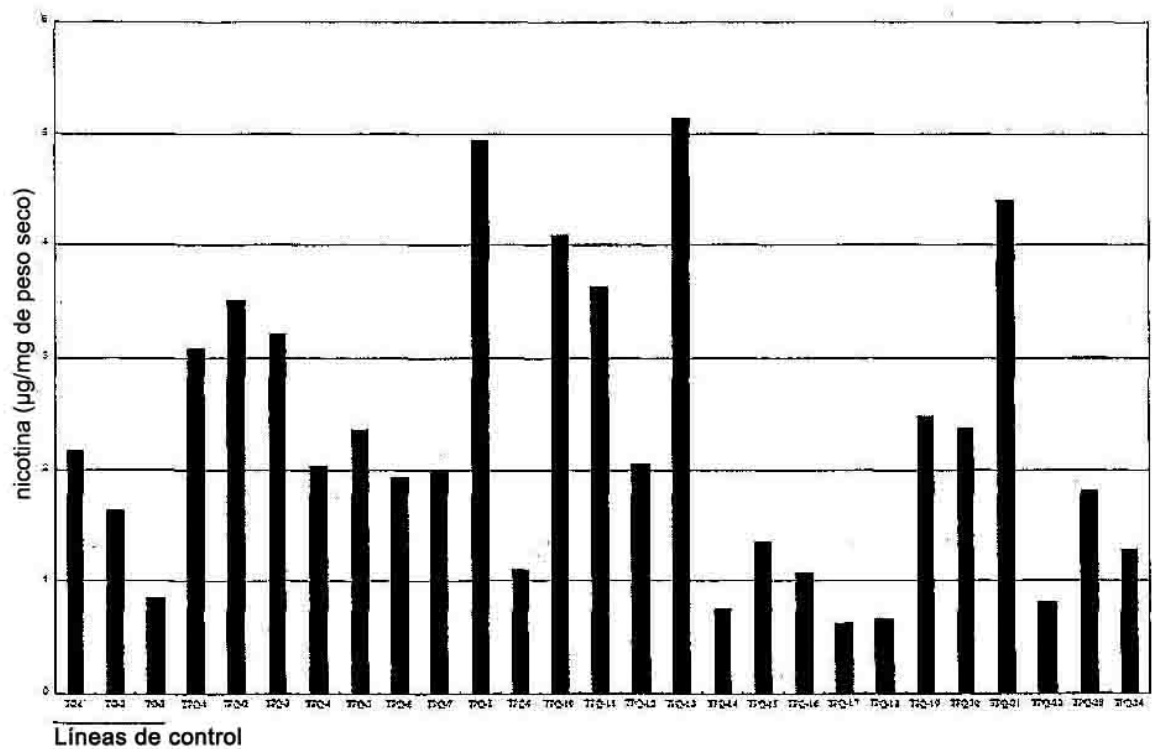
## Figura 16

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS.



**Figura 17**

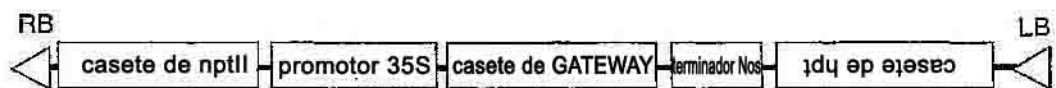
Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.



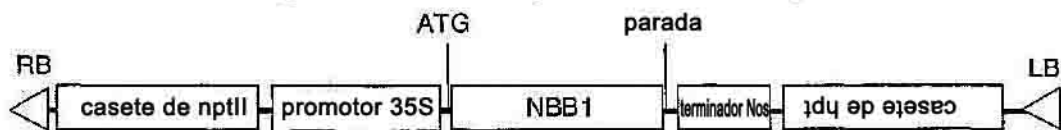


## Figuras 18A-18C

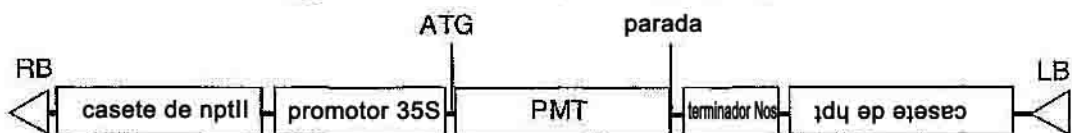
**Figura 18A** Región de ADN-T de pGWB2



**Figura 18B** Región de ADN-T de p35S-NBB1

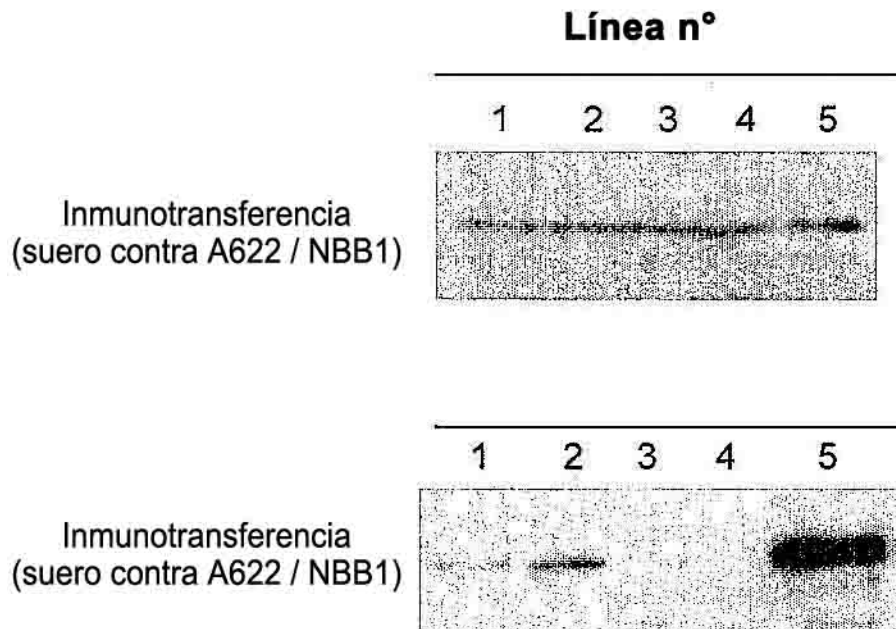


**Figura 18C** Región de ADN-T de p35S-PMT



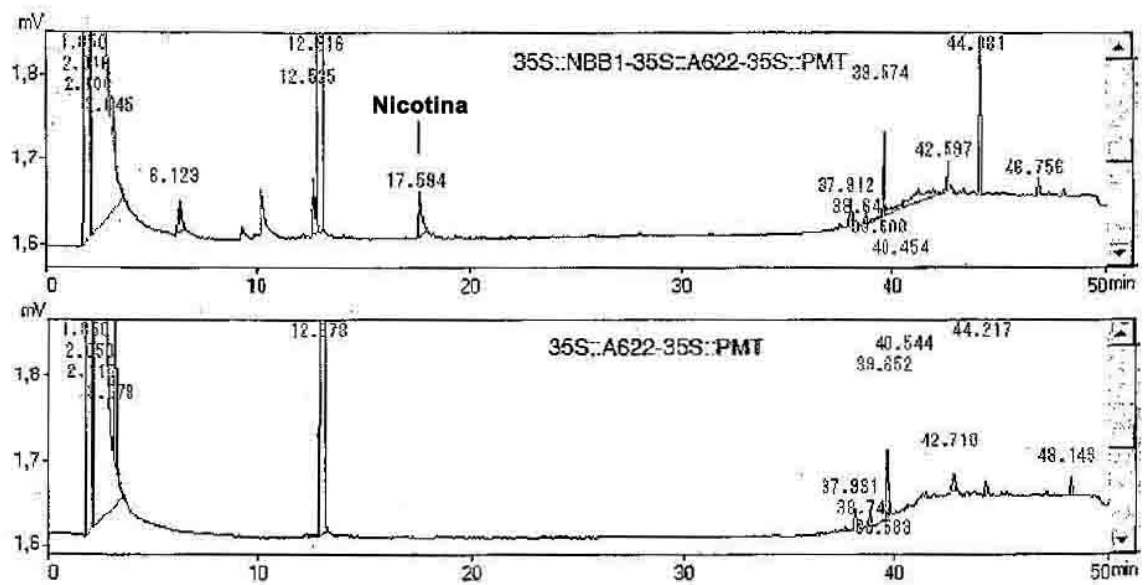
## Figura 19

**Análisis de inmunotransferencia de líneas de  
*Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes  
de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT**



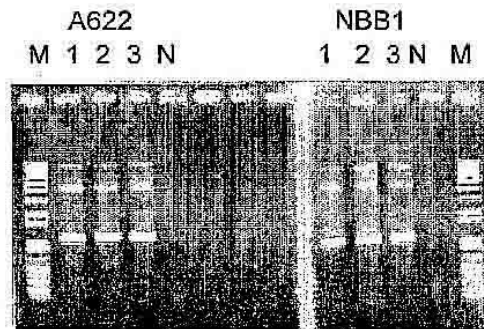
**Figura 20**

Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT



## Figuras 21A-21B

**Figura 21A** Confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en bácmidos recombinantes



**Figura 21B** Detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos infectadas y eluatos de columnas de Ni-NTA

