



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 224**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04797791 .3**
96 Fecha de presentación : **10.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1682667**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Sistema de expresión de planta derivado de virus de ARN.**

30 Prioridad: **10.11.2003 PCT/EP03/12530**
07.07.2004 EP 04016012

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2010

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

72 Inventor/es: **Marillonnet, Sylvestre;**
Thoeringer, Carola;
Klimyuk, Victor y
Gleba, Yuri

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Sistema de expresión de planta derivado de virus de ARN.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a plantas, partes de plantas o cultivos de células de plantas que tienen un ADN heterólogo que codifica un replicón de ARN para expresar una secuencia de interés. La invención también proporciona un proceso para expresar una secuencia de interés en plantas, partes de plantas o cultivos de células de plantas. El proceso y los vectores proporcionan las células de planta con una frecuencia aumentada de formación de ARN de replicón de ARN derivado de virus. Este ADN heterólogo o parte (partes) del mismo puede incorporarse de manera estable en el ADN cromosomal o episomal nuclear de la planta o suministrarse de manera transitoria. La invención también proporciona procesos de transformación de plantas mediados por *Agrobacterium* con vectores virales (ARN) o replicones virales (ARN).

15 **Antecedentes de la invención**

Entre los sistemas de expresión de transgénicos de planta, la expresión de un transgénico bajo el control de un promotor heterólogo ha estado en uso durante varios años. Aparte de esos sistemas de expresión de planta convencionales, pueden usarse los sistemas de expresión basados en virus para la producción rápida de proteína en plantas (para repaso, ver: Porta & Lomonosoff, 1996, *Mol. Biotechnol.*, 5, 209-221; Yusibov *et al.*, 1999, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 240, 81-94) y son una herramienta poderosa para los estudios de genómicos funcionales (Dalmay *et al.*, 2000, *Plant Cell*, 12, 369-379; Ratcliff *et al.*, 2001, *Plant J.*, 25, 237-245; Escobar *et al.*, 2003, *Plant Cell*, 15, 1507-1523). Numerosas publicaciones y Patentes en el campo describen sistemas basados en vectores virales de ADN y ARN (Kumagai *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 427-430; Mallory *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20, 622-625; Mor *et al.*, 2003, *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 430-437; US5316931; US5589367; US5966785; US5491076; US5977438; US981236; WO02088369; WO02097080; WO9854342). Los sistemas existentes de vector viral están usualmente restringidos a un estrecho rango de huésped en términos de su mejor desempeño y aún del nivel de expresión de esos vectores en su huésped más favorable está muy por debajo de los límites biológicos superiores del sistema. Una cuestión importante de los sistemas basados en virus es el método de suministro del replicón viral a una célula de planta. El método más ampliamente aplicado de suministro para la producción a gran escala (producción simultánea en diversas plantas, por ejemplo, en un terreno de granja o un invernadero) es el uso de copias infecciosas de vectores virales de ARN (Kumagai *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1679-1683). Debido a una tendencia relativamente alta de los vectores recombinantes de ARN viral para perder los insertos heterólogos durante los ciclos de su replicación, el método requiere la transcripción *in vitro* de moldes de ADN, y como resultado es ineficaz y costoso. Otro enfoque para resolver el problema del suministro podría ser la presencia de un precursor de replicón de ARN viral en cada célula de una planta transgénica, de modo que pudiera liberarse al activar el proceso de replicación complementando una función del vector viral (por ejemplo usando un virus auxiliar - Patente US5965794) o usando otros sistemas de intercambio regulados (por ejemplo la recombinación específica en sitio - Patente US6632980).

A pesar de las muchas publicaciones en el campo que incluyen tecnologías patentadas, aún no hay sistemas de producción a gran escala basados en virus que funcionen con eficacia suficiente y rindan para la producción comercial de alto rendimiento, predominantemente debido a dos razones principales:

En primer lugar, los sistemas de expresión de plantas transitorias basados en virus generalmente se restringen a huéspedes específicos, que pueden no ser adecuados para el cultivo a gran escala debido a su susceptibilidad a los factores ambientales. Además, generalmente están restringidos a ciertas partes de un huésped de planta, excluyendo por lo tanto la mayoría de la biomasa de la planta del proceso de producción, y como resultado se minimiza la producción relativa del producto recombinante por unidad de biomasa de planta por debajo de un nivel comparable al que se logra con un promotor de transcripción convencional en una planta transgénica;

En segundo lugar, los intentos para el cambio de escala del sistema de producción basado en virus a través de generar huéspedes de planta transgénicos que tengan el precursor de replicón viral establemente integrado en cada célula tampoco han proporcionado una solución, en particular debido al bajo desempeño de los replicones en esa posición, a la "escapatoria" del gen de interés para expresarse de ese replicón y a la falta de un sistema de intercambio eficaz para esos vectores. Se logró cierto progreso con los vectores basados en PVX usando supresores del silenciamiento de PTGS como activadores de la formación del replicón de ARN (Mallory *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.*, 20, 622-625), pero el sistema es todavía impráctico, ya que no se proporciona una solución para un control eficaz del intercambio (supresor de PTGS) que activa la replicación del vector viral. Sin embargo, este sistema proporcionó un nivel de expresión del gen GUS que alcanzó el 3% de la proteína soluble total (TSP, siglas en inglés), que es el mejor que se conoce hasta ahora para este tipo de sistema, pero que aún no es mejor que un sistema convencional de expresión transgénica bajo el control de un promotor fuerte. Otro sistema de inducción basado en un virus de planta de ARN tripartita (Mori *et al.*, 2001, *Plant J.*, 27, 79-86), el Virus del Mosaico del Bromo (BMV, siglas en inglés), dio una producción muy baja de la proteína de interés (3-4 µg/g de peso fresco), que es comparable con las producciones proporcionadas por los promotores transcripcionales convencionales.

Los bajos niveles de expresión hasta ahora logrados con los sistemas de expresión de planta son una razón principal del por qué estos sistemas son duramente competitivos con otros sistemas de expresión como los sistemas de expresión de células bacterianas, fúngicas o de insecto. Los niveles de expresión bajos dan lugar a costes muy altos aguas abajo para el aislamiento de la proteína y la purificación en un entorno amplio del material de planta. Por lo tanto, los costes para el procesamiento aguas abajo disminuyen rápidamente, a medida que se incrementa la producción de la proteína o del producto de interés por unidad de biomasa de planta.

Actualmente no hay un sistema de expresión transgénica de planta a gran escala cuya producción y cuya eficacia pudieran ser suficientemente altas como para competir en el mercado con otros sistemas de expresión a gran escala tales como los sistemas de expresión de células bacterianas, fúngicas o de insecto. Una expresión de planta así debería cumplir lo mejor posible con los siguientes criterios:

(i) alta producción, incluyendo la expresión de la proteína de interés en tantos tejidos de planta como fuera posible y en muchas células de esos tejidos.

(ii) para prevenir un efecto nocivo de la expresión de la proteína en el crecimiento de la planta, la expresión de la proteína o del producto de interés debería ser intercambiable de modo que la expresión pueda ser intercambiada en un punto deseado en el tiempo.

(iii) el intercambio debería ser tal que la expresión pueda intercambiarse simultáneamente o casi simultáneamente en todos los tejidos o células de una planta y, al mismo tiempo, en todas las plantas de un grupo de plantas seleccionado, por ejemplo, en todas las plantas de un lote de plantas seleccionado. Típicamente, la proteína o el producto de interés se acumula en cada célula que produce ese producto o proteína hasta un cierto punto. Sin embargo, durante la acumulación se establecen con frecuencia procesos degradantes que tienden a reducir la producción o la calidad de la proteína o del producto de interés. Por lo tanto, hay un punto óptimo en el tiempo después del intercambio de la expresión, en el que el producto o la proteína de interés debería recogerse. Este punto óptimo en el tiempo debería alcanzarse al mismo tiempo en todos los tejidos o células de una planta y en todas las plantas de un lote seleccionado, para hacer el proceso general eficiente y provechoso.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta para un sistema de expresión de planta de alta producción. Otro objetivo es el proporcionar un proceso para expresar transitoriamente una secuencia de interés en una de planta, parte de planta o cultivo de célula de planta. Otro objetivo de la invención es el proporcionar un proceso eficaz para expresar una o más secuencias de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, por medio del cual el proceso pueda usarse con eficacia a gran escala. Además, un objetivo de la invención es el proporcionar un método para controlar la expresión de la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, que sea de seguridad ecológica y biológica mejorada.

Descripción general de la invención

Los objetivos anteriores se logran transformando una planta, parte de una planta o un cultivo de célula de planta que contenga en el núcleo de la célula un ADN heterólogo con una secuencia que codifique un replicón de ARN, estando esa secuencia unida o pudiendo unirse operativamente a un promotor de transcripción, en el que la secuencia que codifica un replicón de ARN contiene:

(i) secuencias para la función de replicón de ese replicón de ARN, procediendo esas secuencias de una secuencia de un virus de ARN de planta, y

(ii) una secuencia de interés para expresarse a partir de ese replicón de ARN,

por lo tanto las secuencias para la función del replicón corresponden a las secuencias del virus de ARN de planta y muestran en las posiciones seleccionadas de la secuencia del virus de ARN de planta diferencias conservadoras de la función de la secuencia del virus de ARN de planta. Esas diferencias pueden causar una frecuencia incrementada de formación del replicón en comparación con un replicón de ARN que no muestre esas diferencias. Preferiblemente, la planta, parte de la planta o cultivo de célula de planta se transforma de manera estable con el ADN heterólogo.

Además, los objetivos anteriores se logran a través de un proceso de expresión de una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, que comprende:

(a) proporcionar una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta que contenga en el núcleo de la célula un ADN heterólogo como se definió anteriormente, y

(b) producir la expresión de la secuencia de interés.

Las células de esa planta, parte de planta o cultivo de célula de planta pueden transformarse de manera estable o transitoria con el ADN heterólogo.

La invención también proporciona un proceso para producir una planta transgénica establemente transformada en un cromosoma nuclear con un ADN heterólogo como se definió anteriormente, que comprende transformar una planta o una parte de planta con un vector que contenga al ADN heterólogo, seleccionar el tejido de la planta que contenga en un cromosoma nuclear el ADN heterólogo, y regenerar la planta transgénica a partir de ese tejido.

La invención también proporciona un proceso para expresar transitoriamente una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, que comprende:

transformar una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta con un ADN heterólogo que tenga una secuencia que codifique un replicón de ARN unido o que puede unirse operativamente a un promotor de transcripción,

en el que la secuencia que codifica un replicón de ARN contiene:

(i) secuencias para la función de replicón de ese replicón de ARN, procediendo esas secuencias derivadas de una secuencia de un virus de ARN de planta,

(ii) una secuencia de interés,

por lo que las secuencias para la función del replicón muestran, en posiciones seleccionadas de las secuencias del virus de ARN de planta las diferencias conservadoras de la función de la secuencia de ese virus de ARN de planta, como se define además en la reivindicación 25. Esas diferencias pueden causar una frecuencia incrementada de formación del replicón en comparación con un replicón de ARN que no muestre esas deferencias.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico para producir la planta, parte de planta o cultivo de célula de planta de la invención o para llevar a cabo el proceso de la invención. La molécula de ácido nucleico es como se define en las reivindicaciones y como se define además en la descripción más adelante con referencia a la planta, parte de planta o cultivo de célula de planta y al proceso de la invención.

Cuando los inventores de la presente invención introdujeron un ADN heterólogo que codificaba los replicones virales de ARN en los cromosomas nucleares de las plantas o las partes de planta para expresar una proteína de interés codificada en ese replicón de ARN, encontraron que la frecuencia con la que aparecían los replicones de ARN en el citosol era muy baja y ocurría sólo en una pequeña fracción de las células que contenía al ADN heterólogo. De acuerdo con ello, el nivel de expresión de la proteína de interés también era muy bajo. Se consideraron muchas razones posibles para este problema, incluyendo efectos de posición del cromosoma, elementos inadecuados de regulación de la transcripción, silenciamiento de gen, transporte defectuoso del replicón desde el núcleo hacia el citosol, un efecto nocivo de la secuencia de interés en la transcripción, función de procesamiento del ARN o el replicón, etc. Entonces, sorprendentemente, se encontró que ciertas porciones de la secuencia ricas en A/T(U) en el replicón eran las responsables de la baja frecuencia de formación del replicón en el citosol. Cuando se suprimió el efecto nocivo de esas porciones de la secuencia ricas en A/T(U), la frecuencia de formación del replicón en el citosol creció con fuerza, dando como resultado una producción fuertemente incrementada de la proteína de interés.

La eficacia de la presente invención es tal que se logra una nueva dimensión en los sistemas de expresión de planta. Los niveles de expresión que se alcanzan con la presente invención son tales que los gastos para el procesamiento aguas abajo (incluyendo la separación y la purificación de la proteína de interés) son lo suficientemente bajos para hacer al proceso de la invención competitivo con otros sistemas de expresión a gran escala. En los sistemas de expresión de la técnica anterior que usan plantas establemente transformadas, el nivel de expresión es bajo aún si se usan vectores basados en virus, dado que los replicones se producen en una pequeña fracción de las células. Los replicones que se propagan en la planta no pueden remediar este problema, ya que la propagación es baja, notablemente a través de grandes distancias. Por lo tanto, la expresión no procede de manera uniforme en la planta y la degradación de la proteína de interés ya habrá tenido lugar en algunas partes de la planta mientras en otras la expresión de la proteína aún no se ha iniciado. La invención permite activar la expresión de manera uniforme a través de la planta. Los replicones de las células vecinas pueden invadir rápidamente la pequeña fracción de células que no produce un replicón. La invención proporciona el primer sistema de expresión de planta de alta producción que puede usarse a gran escala. La invención permite inclusive producir dos o más replicones en la misma célula, con lo cual la probabilidad de tener ambos replicones en las mismas células es aún muy alta. Además, la eficacia del sistema de expresión de la invención es tal que se reduce de otra forma la especificidad limitante de planta de los virus de ARN.

La eficacia mejorada como se describe anteriormente puede lograrse en combinación con la transformación estable así como con la transformación transitoria de las plantas, partes de planta o células de planta.

La planta, parte de planta o cultivo de célula de planta transformada (opcionalmente de manera estable) y la molécula de ácido nucleico tienen un ADN heterólogo que codifica un replicón de ARN. La secuencia que codifica un replicón de ARN contiene:

(i) secuencias para la función de replicón del replicón de ARN, procediendo esas secuencias de una secuencia de un virus de ARN de planta, y

(ii) una secuencia de interés a expresarse a partir de ese replicón de ARN.

La secuencia que codifica un replicón de ARN contiene una secuencia de interés que se expresará desde el replicón (ii) de ARN. La secuencia de interés que se expresará puede conducir a la formación de un ARN de interés, como un ARN para la interferencia de ARN para suprimir una función de la planta. Preferiblemente, sin embargo, la secuencia de interés codifica una proteína de interés y contiene secuencias reguladoras para trasladar la proteína de interés, por ejemplo, a partir del replicón de ARN o a partir del ARN subgenómico del replicón de ARN. La secuencia de interés puede incluir una codificación de secuencia para una señal diana para dirigir la proteína de interés hacia un compartimiento en particular de la célula o para secretar la secuencia de interés. También pueden codificarse las secuencias de aminoácido para separar la proteína de interés a partir de una señal de direccionamiento. La secuencia de interés es una secuencia que es heteróloga a cualesquiera secuencias del virus de ARN de planta, es decir, el proceso de la invención no comprende un caso restringido para la transformación de un virus de ARN de planta de tipo silvestre dentro de plantas u hojas de plantas. Por lo tanto, la proteína de interés no es una proteína codificada por el virus de ARN de planta del que se derivan las secuencias para la función del replicón.

Las secuencias para la función (i) del replicón del replicón de ARN corresponden a las secuencias del virus de ARN de planta, entre otras, en que el primero puede ser una copia de ADN del último. Las secuencias para la función del replicón proporcionan el replicón de ARN con la función para replicar en el citosol. Las secuencias para la función del replicón codifican una polimerasa de ARN (replicasa) dependiente del ARN. Las secuencias para la función del replicón pueden codificar además las funciones de un replicón de ARN como una o más proteínas implicadas en la propagación célula a célula o sistémica de un virus de ARN en una planta, como una proteína de movimiento o una proteína de cubierta. Las secuencias para la función del replicón derivan preferiblemente de una secuencia de un virus de ARN de planta, dado que los virus de ARN de planta son una fuente fácilmente accesible para las funciones del replicón. "Que derivan" significa que las secuencias para la función del replicón son esencialmente una copia del ADN de las correspondientes secuencias del virus de ADN y la copia de ADN constituye una parte del ADN heterólogo contenido, o que será introducido, en el núcleo de la célula. "Que derivan" significa también que las secuencias para la función del replicón no son una copia exacta del ADN de la correspondiente secuencia de ARN del virus de ARN, sino que muestran diferencias de conservación de la función como se describe más adelante. Dado que esas diferencias son de conservación de la función, las secuencias para la función del replicón codifican preferiblemente proteínas capaces de realizar las funciones de replicón de manera similar a como lo hacen para el virus de ARN. Esas diferencias de conservación de la función pueden sin embargo, dar como resultado diferencias cuantitativas en la funcionalidad de las proteínas virales codificadas, en comparación con un caso en el que esas diferencias de conservación de la función estén ausentes. En una realización, el ADN heterólogo y las secuencias para la función del replicón no codifican una proteína requerida para el movimiento de larga distancia como una proteína de cubierta (en particular una proteína de cubierta tobamoviral). En otra realización, el ADN heterólogo carece de una proteína de movimiento. Por lo tanto, las secuencias para la función del replicón del ADN heterólogo no tienen que codificar todas las funciones del virus de ARN a partir del cual se derivan las secuencias para la función del replicón.

Las secuencias para la función del replicón muestran, en ubicaciones seleccionadas de la secuencia del virus de ARN de planta, diferencias de conservación de la función con respecto a la secuencia del virus de ARN de planta, causando esas diferencias una frecuencia incrementada de formación de replicón en comparación con un replicón de ARN que no muestre las diferencias. Esas diferencias son causales para la frecuencia incrementada de formación del replicón en las células de las plantas, una vez que el proceso general ha sido activado (véase más adelante). La conexión causal entre la frecuencia incrementada de formación del replicón y dichas diferencias puede ensayarse experimentalmente comparando la frecuencia de formación del replicón entre las secuencias para la función del replicón que tienen las diferencias y las secuencias para la función del replicón que no tienen las diferencias. La comparación experimental puede hacerse por ejemplo, contando los protoplastos que expresan la secuencia de interés como se describe en los ejemplos. Preferiblemente, para este propósito se usa una secuencia de interés que codifica una proteína indicadora fácilmente detectable como la proteína verde fluorescente (GFP, siglas en inglés). Como además se describe más adelante, también es preferible realizar la comparación experimental con replicones de ARN que no pueden propagarse de célula a célula.

Las diferencias de conservación de la función se introducen en las secuencias para la función del replicón en ubicaciones seleccionadas de la secuencia del virus de ARN de planta. Las ubicaciones seleccionadas son las ubicaciones en las secuencias para la función del replicón del virus de ARN de planta que son responsables de una baja probabilidad de que aparezca en el citosol, como un replicón funcional, un replicón de ARN transcrito en el núcleo. Preferiblemente, esas ubicaciones seleccionadas tienen un alto contenido de A/T(U), es decir, un alto contenido de A y/o un alto contenido de T (un alto contenido de U a nivel del ARN), o tienen sitios crípticos de corte y empalme, es decir, partes de secuencia que puede reconocer la maquinaria de corte y empalme nuclear como sitios de corte y empalme. Las ubicaciones seleccionadas pueden identificarse en un virus de ARN en el cual está basado un replicón de ARN analizando el perfil de ARN del virus de ARN como se ejemplifica más adelante. Además, las ubicaciones seleccionadas pueden identificarse experimentalmente analizando el ARN formado en una célula de planta después de la transformación con un ADN heterólogo que codifique un replicón de ARN que no muestre las diferencias (de conservación de la función) de acuerdo con la invención. Este análisis experimental puede hacerse por RT-PCR, preferiblemente junto con la secuenciación de los productos de RT-PCR. En el ensayo RT-PCR, la replicasa se vuelve preferiblemente vuelta disfuncional por ejemplo por una mutación de desplazamiento de fase para impedir que se amplifiquen los replicones de ARN que alcanzan el citoplasma; esa amplificación puede conducir a la contaminación de transcritos de ARN con el virus de tipo silvestre o a una sobre representación de los replicones de ARN amplificados en el citoplasma. De esta manera, pueden identificarse productos de corte y empalme no deseados que indican eventos

de corte y empalme destruyendo el replicón de ARN. Además, los sitios exactos de corte y empalme no deseados pueden identificarse y después remediarse introduciendo las diferencias de conservación de la función en las ubicaciones seleccionadas.

5 Por lo tanto, la invención también proporciona un proceso para expresar una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, en el que: (A) se proporciona la planta, parte de planta o cultivo de célula de planta con un ADN heterólogo como se define en este documento, pero carente de las diferencias de conservación de la función; (B) se ensaya el ARN derivado del ADN heterólogo para los productos de corte y empalme no deseados en las secuencias para la función del replicón (por ejemplo, por RT-PCR); (C) se identifica (por ejemplo en la secuencia de un producto de RT-PCR), una ubicación seleccionada como una ubicación de un evento de corte y empalme no deseado; (D) se introduce una diferencia de conservación de la función (por ejemplo, un intrón) de acuerdo con la invención dentro de, o cerca de, la ubicación seleccionada identificada en la etapa (C) dentro del ADN heterólogo de la etapa (A) para producir el ADN heterólogo de la invención, y expresar una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta de acuerdo con la invención, por ejemplo a partir de una planta estable y transitoriamente transformada con el ADN heterólogo de la invención.

Las diferencias de conservación de la función causan una frecuencia incrementada de formación del replicón de ARN suprimiendo el efecto nocivo de las ubicaciones seleccionadas en la frecuencia de formación del replicón de ARN. Las diferencias de conservación de la función pueden comprender una reducción de un alto contenido de A/U en el replicón de ARN, reduciendo un alto contenido de A/T en las secuencias para la función del replicón de la secuencia que codifica el replicón de ARN. El alto contenido de A/U puede reducirse con la eliminación al menos parcial o el reemplazo al menos parcial a través de bases G/C (por ejemplo., usando la degeneración del código genético), siempre que esas diferencias sean conservadoras de la función. Además, pueden eliminarse los sitios de corte y empalme crípticos que flanquean las regiones ricas en A/U de esas secuencias derivadas del virus de ARN de planta. Las diferencias conservadas de la función pueden introducirse en una o, preferiblemente, en varias ubicaciones seleccionadas.

En la presente invención, las diferencias de conservación de la función comprenden la inserción de uno o más intrones, cerca o dentro de las ubicaciones ricas en A/U de las secuencias que derivan de las secuencias del virus de ARN de planta. Sorprendentemente, se ha encontrado que la introducción de intrones en o cerca de las ubicaciones ricas en A/U da como resultado una frecuencia incrementada de la formación del replicón de ARN. Pueden introducirse varios intrones y en este documento se proporcionan ejemplos para diversos números de intrones introducidos. Los efectos de más de un intrón son acumulativos. Además, la inserción del intrón puede combinarse con otras diferencias de conservación de la función en otras ubicaciones seleccionadas.

También se describen diferencias de conservación de la función que comprenden la inserción de una o más secuencias que pueden formar intrones nucleares cerca o dentro de las ubicaciones ricas en A/U de las secuencias que derivan de las secuencias del virus de ARN de planta. La Figura 8 muestra un ejemplo para la introducción de secuencias que pueden formar un intrón nuclear, aunque se vaya a expresar en el gen de interés. En el ejemplo de la Figura 8, el intrón se forma a partir de dos mitades de intrón al giro catalizado de recombinasa de una parte del ADN heterólogo. Este principio también puede aplicarse a las secuencias para la función del replicón del replicón de ARN. En una realización en la que se forman dos replicones de ARN diferentes en la misma célula, la recombinación entre los dos diferentes replicones puede dar como resultado la formación de un intrón a partir de dos mitades de intrón presentes en replicones diferentes. Además, un replicón de ARN puede formarse a través de la recombinación entre dos precursores, ninguno de los cuales es un replicón. También en este caso, puede ensamblarse un intrón a partir de dos mitades de intrón derivadas de diferentes moléculas precursoras.

La planta, parte de planta o cultivo de célula de planta de la invención puede transformarse de manera estable con el ADN heterólogo. Transformarse de manera estable significa que contienen el ADN heterólogo en el núcleo de la célula de modo que el ADN heterólogo se mantiene en el núcleo de la célula como se mantienen los cromosomas nucleares. El ADN heterólogo puede contenerse en o puede ser un elemento episomal. Sin embargo, preferiblemente el ADN heterólogo se incorpora de manera estable en un cromosoma nuclear de tal modo que las células de la progenie o las plantas progenie pueden heredarlo. Los métodos de producción de plantas, partes de plantas o cultivos de células de plantas que están transformados de manera estable se conocen en la técnica de la biotecnología de plantas. Estos métodos usualmente requieren la selección de transformantes para la transformación estable usando un agente selectivo y un gen marcador seleccionable.

Preferiblemente, todas las plantas, partes de la planta o cultivos de células de plantas contienen en su núcleo al ADN heterólogo para dar una alta producción de una proteína de interés. Más preferiblemente, las células contienen el ADN heterólogo integrado de manera estable en un cromosoma nuclear. En el caso de una planta, esto significa que la planta es una planta transgénica.

El ADN heterólogo que tiene la secuencia que codifica al replicón de ARN está unido o puede unirse operativamente a un promotor de transcripción. Como alternativa, la secuencia que codifica el replicón de ARN está unida o puede unirse operativamente a un promotor de transcripción. Si el ADN heterólogo o la secuencia están unidos operativamente con el promotor de transcripción, el promotor de transcripción es preferiblemente un promotor regulado, como un promotor inducible, específico de tejido o regulado evolutivamente para hacer regulable la expresión de la secuencia de interés. Más preferiblemente, el promotor es inducible o regulado evolutivamente, lo que permite inducir

la expresión en un momento deseado o activar la expresión cuando la planta alcanza un estado de desarrollo definido, respectivamente. Por ejemplo, la expresión de la secuencia de interés puede activarse en las semillas de las plantas si el promotor es un promotor específico de semillas. La invención es de gran valor para proporcionar tejidos específicos (por ejemplo, tejidos de semillas) con replicones de ARN, con lo que esos tejidos pueden estar menos adaptados a la propagación de célula a célula del replicón que, por ejemplo, el tejido foliar. Los más preferibles son los promotores químicamente regulados, dado que permiten activar la expresión a voluntad en todos o en la mayoría de los tejidos de una planta. Aún más importante, los promotores químicamente inducibles son los promotores de elección para aplicaciones a gran escala, dado que el inductor químico puede aplicarse a un gran número de plantas al mismo tiempo. Los ejemplos de promotores regulados se conocen en la técnica. Las aplicaciones a gran escala son aplicaciones en las que una secuencia de interés seleccionada se expresa conjuntamente en muchas plantas. La aplicación a gran escala puede realizarse en un invernadero.

La secuencia que codifica un replicón de ARN puede estar, como alternativa, unida operativamente a un promotor de transcripción, lo que permite activar la expresión de la secuencia de interés uniéndolo operativamente con un promotor la secuencia que codifica un replicón de ARN. Hay varias formas de abreviar esta realización en la práctica. Una opción es separar, en el ADN heterólogo, a la secuencia que codifica el replicón de ARN y al promotor, a través de un bloque de secuencia que impide un enlace operativo entre el promotor y el ADN heterólogo. Este bloque de secuencia puede estar flanqueado por sitios de recombinación de modo que una recombinasa que reconoce esos sitios de recombinación puede cortar el bloque. Por lo tanto puede establecerse el enlace operativo para la transcripción de la secuencia que codifica el replicón de ARN y puede activarse la expresión. Otra opción es tener una parte de una secuencia necesaria para la transcripción (por ejemplo, un promotor o parte del promotor) en orientación girada y flanqueada por sitios de recombinación. El proporcionar una recombinasa adecuada puede volver a girar la parte de la secuencia a la orientación correcta, con lo que puede establecerse un enlace operativo.

En una realización de la invención, la secuencia que codifica un replicón de ARN tiene uno o más segmentos que codifican juntos ese replicón de ARN, es decir, un ADN continuo no codifica el replicón de ARN. En vez de ello, dos o más segmentos codifican de manera discontinua el replicón de ARN, por lo que esos segmentos pueden estar presentes en el mismo cromosoma, preferiblemente contiguos entre sí. La formación del replicón de ARN puede requerir entonces la transposición de los segmentos, por ejemplo, por recombinación. Como un ejemplo, una parte de una secuencia para la función del replicón (por ejemplo, una parte de una secuencia que codifica una replicasa) puede estar presente en el ADN heterólogo en una orientación girada con relación a otras partes de esa secuencia. La parte girada puede estar flanqueada por sitios de recombinación. Entonces el transcrito del ADN heterólogo no será un replicón, dado que la función del replicón no puede proporcionarse (por ejemplo, porque el transcrito no codifica una replicasa funcional). Al proporcionar una recombinasa específica del sitio que reconozca los sitios de recombinación, puede girarse de nuevo uno de los segmentos de tal modo que una función del replicón se codifica continuamente. En esta realización, el proporcionar la recombinasa puede funcionar como un activador para activar la formación del replicón y la expresión de una secuencia de interés (véase más adelante). Esta realización se realiza preferiblemente en conexión con plantas, partes de planta o cultivos de células de planta transformadas de manera estable.

De manera alternativa, los segmentos pueden estar presentes en diferentes cromosomas. La formación de un replicón de ARN requerirá entonces la transcripción de ambos segmentos y el trans-corte y empalme de ambos transcritos para ensamblar el replicón de ARN. Esta realización puede usarse para segregar rápidamente los segmentos que codifican juntos al replicón de ARN en las plantas o células de la progenie, como se describe con detalle en la Patente PCT/EP03/02986.

El proceso de la invención puede comprender las etapas (a) y (b). La etapa (a) puede comprender la transformación estable o transitoria de una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta con el ADN heterólogo de la invención. Como se ha indicado anteriormente, se prefiere la transformación estable de un cromosoma nuclear. Preferiblemente, el proceso de la invención es un proceso para expresar una proteína de interés codificada por la secuencia de interés. La etapa (b) comprende causar la expresión de la secuencia de interés, por ejemplo, activando la expresión. Ya se han mencionado diversos métodos para causar o activar la expresión. Los ejemplos incluyen inducir un promotor inducible unido operativamente al ADN heterólogo; llevar ese ADN heterólogo bajo la unión operativa de un promotor usando la recombinación; establecer la codificación continua de una secuencia para la formación del replicón usando la recombinación, etc. Si se usa una recombinasa para activar el proceso de la invención, esa recombinasa puede proporcionarse de manera transitoria a la planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, lo que actuaría como un intercambio para la etapa (b). Alternativamente, la recombinasa puede codificarse de manera estable en las células, y expresar la recombinasa bajo el control de un promotor inducible, preferiblemente regulado. La inducción de la expresión de la recombinasa induciendo el promotor puede causar entonces la expresión en la etapa (b). En el caso de la transformación transitoria, la etapa (b) puede lograrse automáticamente al realizar el paso (a).

Preferiblemente, el proceso de la invención se realiza con muchas plantas en paralelo, proporcionando muchas plantas de acuerdo con (a) y produciendo la expresión de la secuencia de interés de acuerdo con (b) con todas las plantas en una etapa, por ejemplo, aplicando un inductor químico para un promotor químicamente inducible a todas las plantas, por ejemplo por aspersión.

En una realización importante del proceso de la invención, la planta o las partes de la planta (por ejemplo, las hojas) se transforman de manera transitoria con el ADN heterólogo de la invención para la expresión transitoria de la secuencia de interés. El término "transformación transitoria" significa la introducción del ADN heterólogo sin la

selección de las células transformadas para la incorporación estable del ADN heterólogo en el cromosoma de una planta. La transformación transitoria usualmente proporciona la expresión transitoria del(los) gen(es) codificado(s) por el ADN heterólogo. La transformación transitoria puede lograrse a través de cualquiera de los métodos de transformación proporcionados más adelante. Sin embargo, preferiblemente se realiza a través de transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* del T-ADN que contiene el ADN heterólogo de la invención. Un método preferible de transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* es la agroinfiltración. La agroinfiltración (agro-inoculación) es la más preferible. Los más rápidos y más altos niveles de expresión de la secuencia de interés pueden obtenerse si se transforman por agroinfiltración las plantas completas (es decir, aéreas que incluyen todas las hojas). Esto puede lograrse sumergiendo las plantas hacia abajo en la suspensión de *Agrobacterium*, aplicando vacío, y liberando rápidamente el vacío.

En una realización preferida del proceso de expresión transitoria de una secuencia de interés, la secuencia que codifica el replicón de ARN está unida operativamente a un promotor transcripcional, preferiblemente un promotor transcripcional constitutivo. En otra realización preferida, la planta pertenece al género *Nicotiana* y las secuencias para la función del replicón derivan de un tobamovirus, preferiblemente del virus del mosaico del tabaco. En una realización particularmente preferida, las plantas de tabaco que incluyen el tallo y todas las hojas se transforman transitoriamente por agroinfiltración. Esta última realización puede usarse para aplicaciones a gran escala del proceso de la invención. En las aplicaciones a gran escala, el proceso se aplica de forma simultánea a muchas plantas (al menos a 5, preferiblemente al menos a 10, más preferiblemente al menos a 100 plantas).

La presente invención puede aplicarse principalmente a cualquier planta para la cual existen virus de ARN infecciosos. Los pares adecuados de planta/virus de ARN pueden derivarse de la lista de virus de ARN que se proporciona más adelante. Debido a la altísima eficacia de la formación del replicón de acuerdo con la invención, la especificidad de especies de planta de los virus de plantas es mucho menos pronunciada cuando se practica esta invención. De manera similar, la presente invención puede usarse con replicones de ARN basados en cualquier virus de ARN. Los virus de ARN han evolucionado generalmente fuera del núcleo de la célula de sus plantas huéspedes, y habrán elegido ubicaciones que hacen ineficaz a un replicón basado en ese virus cuando el replicón se produce dentro del núcleo de la célula, principalmente si el replicón está codificado de manera estable en un cromosoma nuclear. La invención puede aplicarse a todos los virus de ARN, aunque el nivel de mejora puede variar entre virus de ARN de diferentes plantas. Los virus de ARN de planta más preferidos sobre los que puede basarse la invención son los tobamovirus, principalmente el virus del mosaico del tabaco, y los Potexvirus tales como el virus X de la patata. En el caso del virus del mosaico del tabaco, será generalmente la proteína de cubierta la que se reemplaza por la secuencia a expresar. La proteína de movimiento puede eliminarse o reemplazarse por una secuencia a expresar. Preferiblemente, sin embargo, un replicón de ARN derivado del virus del mosaico del tabaco debería codificar la proteína de movimiento y la proteína de movimiento reemplazarse por la secuencia a expresar. Es altamente preferible que el ADN heterólogo carezca de al menos un marco de lectura abierto del virus de ARN de planta, como una proteína de cubierta o una proteína de desplazamiento.

La aplicación principal de la presente invención es la producción de una proteína de interés en plantas, partes de plantas o cultivos de célula de plantas. La proteína de interés es codificada por la secuencia de interés. La secuencia de interés es preferiblemente heteróloga al virus de ARN de planta. En cualquier caso, la secuencia de interés no es una secuencia que tenga o que codifique funciones del virus de ARN.

Si el proceso de la invención se realiza en plantas, son preferibles las plantas que no entren en la cadena alimentaria humana o animal, como las especies *Nicotiana* (por ejemplo, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*). Las partes de plantas son, por ejemplo, órganos de plantas o tejidos específicos de plantas, como hojas o semillas. En este documento, las semillas se consideran como partes de la planta si el proceso de la invención se realiza en las semillas que están creciendo o que están unidas a una planta parental. Sin embargo, las semillas también se consideran como plantas aunque en una determinada etapa del desarrollo de una planta. Más preferiblemente, las plantas de la invención se comercializan o distribuyen como semillas, las semillas crecen como plantas, y la expresión de la secuencia de interés se induce o se activa en un punto deseado de esas plantas.

Muchas especies de plantas, como *Nicotiana tabacum* o *Beta vulgaris* han sido hasta ahora imposibles de transformar con un vector viral o un replicón por medio de transformación mediada con *Agrobacterium*. Puede suponerse que la razón para esta imposibilidad fue la activación de los mecanismos de defensa de la planta en respuesta a un doble reto de la planta con dos patógenos, en concreto *Agrobacterium* y el vector viral. Ahora, los inventores han encontrado que el uso de suspensión altamente diluida de *Agrobacterium* para la transformación mediada por *Agrobacterium* permite lograr una mayor eficacia de transformación con los vectores virales. Por lo tanto, la invención logra una amplia aplicabilidad de transformación del vector viral mediada por *Agrobacterium* para muchas especies de plantas. La suspensión altamente diluida de *Agrobacterium* para esta realización, tiene una concentración de células de la *Agrobacterium* que corresponde a una densidad óptica calculada a 600 nm a lo sumo de 0,04, preferiblemente a lo sumo de 0,01, más preferiblemente a lo sumo de 0,004, y más preferible, a lo sumo de 0,001, en la que las densidades ópticas calculadas se definen por una dilución de al menos 25 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 250 veces y más preferiblemente al menos 1000 veces, respectivamente, de una suspensión de la *Agrobacterium* de una DO de 1,0 a 600 nm. La especie de planta más preferiblemente transformada de acuerdo con esta realización es *Nicotiana tabacum*.

La eficacia de transformación de la transformación del vector viral (ARN) mediada por *Agrobacterium* puede mejorarse adicionalmente usando en el T-ADN el ADN heterólogo de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la invención proporciona un proceso para expresar una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, que comprende:

transformar una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta con una suspensión de *Agrobacteria*, conteniendo la *Agrobacteria* en el T-ADN un ADN heterólogo con una secuencia que codifica un replicón (preferiblemente un replicón de ARN) unida o que puede unirse operativamente a un promotor de la transcripción,

en la que la secuencia que codifica un replicón contiene:

(i) secuencias para la función del replicón de ese replicón, derivándose las secuencias de una secuencia de un virus de planta (preferiblemente un virus de ARN de planta),

(ii) una secuencia de interés a expresar,

en la que dicha suspensión de *Agrobacteria* tiene una concentración de células de la *Agrobacteria* correspondiente a una densidad óptica calculada a 600 nm de a lo sumo de 0,04, preferiblemente a lo sumo de 0,01, más preferiblemente a lo sumo de 0,004, y más preferiblemente a lo sumo de 0,001, en la que las densidades ópticas calculadas se definen por una dilución de al menos un 25 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 250 veces y más preferiblemente al menos 1000 veces, respectivamente, de una suspensión de la *Agrobacteria* de una DO de 1,0 a 600 nm.

Los inventores han encontrado que este proceso no solamente disminuye la probabilidad de que las células de la cepa de *Agrobacterium* se propaguen en el ambiente, mejorando por lo tanto la seguridad biológica de este proceso. El proceso también mejora la eficacia de la expresión de la proteína, presumiblemente disminuyendo la exposición y el estrés para esa planta u hojas de planta después de la infección con una cepa de *Agrobacterium* que es patógena para esa planta. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la eficacia del proceso aumenta, dentro de ciertos límites, con la disminución de la concentración de las suspensiones de *Agrobacterium* usadas para transformar o transfectar las plantas o las partes de planta. Principalmente, la capacidad de los replicones para el desplazamiento de célula a célula, generado en las células de la planta, mejora con la disminución de la concentración de las suspensiones de *Agrobacteria*. Las razones de este fenómeno inesperado aún no se han identificado. Se especula que este fenómeno se debe a una respuesta de la planta a la infección por *Agrobacteria* y que esta respuesta no ocurre (u ocurre a un menor grado) con menores concentraciones de *Agrobacteria*. En los procesos de transformación de la técnica anterior que usan *Agrobacteria*, se usaban concentraciones mucho mayores de *Agrobacteria*, generalmente en el intervalo de una DO de 0,5 a 1,0 a 600 nm.

La planta u hojas de la planta se infiltran preferiblemente con una suspensión de células de la cepa *Agrobacterium*, teniendo la suspensión una concentración de células de *Agrobacteria* que se obtiene diluyendo una suspensión de células de la cepa *Agrobacterium* de una DO (densidad óptica) de 1,0 a 600 nm de al menos 25 veces, preferiblemente al menos de 100 veces, más preferiblemente al menos de 250 veces, y más preferiblemente al menos de 1000 veces. Esas diluciones conducen por lo tanto a que las suspensiones de *Agrobacteria* tengan valores de DO calculados a 600 nm a lo sumo de 0,04, preferiblemente a lo sumo de 0,01, más preferiblemente a lo sumo de 0,004, y más preferible, a lo sumo de 0,001, respectivamente.

Este proceso de usar suspensiones de *Agrobacteria* con valores de DO calculados por debajo de 0,04, puede combinarse con otras realizaciones descritas en esta invención. La infiltración o la agroinfiltración pueden definirse como un método de transformación o transfección usando una suspensión de *Agrobacteria*, en la que se usa una diferencia de presión para introducir a la *Agrobacteria* a presión en un tejido de planta (espacio intercelular).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa el principio general de la invención, basado en la frecuencia incrementada de formación del replicón basada en el virus de ARN.

La Figura 2 muestran el perfil de predicción del intrón de la región transcrita del vector pICH8543. Los números de nucleótidos se proporcionan en el eje horizontal. El eje vertical muestra la probabilidad para la correspondiente región de secuencia/secuencia que va a ser una secuencia codificante (de codificación), para servir como un sitio donante (Donante) o un sitio aceptor (Aceptor). Las partes rodeadas con círculo corresponden a las ubicaciones seleccionadas en la que deberían introducirse las diferencias de conservación de la función.

La Figura 3 muestra el perfil de predicción del intrón de la primera mitad de la región transcrita del vector pICH15466. Las regiones rodeadas con círculo se modificaron (comparar con la Figura 2A) con las diferencias de conservación de la función de acuerdo con la invención.

La Figura 4 muestra el perfil de predicción del intrón de la segunda mitad de la región transcrita del pICH1590. Las regiones rodeadas con círculo se modificaron (comparar con la Figura 2B) con las diferencias de conservación de la función de acuerdo con la invención.

La Figura 5 muestra el perfil de predicción del intrón de la región transcrita del pICH15499. Las regiones rodeadas con círculo corresponden a seis intrones nucleares de la planta insertados.

La Figura 6A y B son representaciones esquemáticas de las regiones de T-ADN de vectores con y sin diferencias de conservación de la función de acuerdo con la invención.

La Figura 7 muestra la expresión de GFP después de la agroinfiltración de las construcciones virales en hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*. Se indica el número de identificación del vector (pICH) para cada área infiltrada.

7A - *Nicotiana benthamiana*, 8 días después de la agroinfiltración;

7B - *Nicotiana tabacum*, 8 días después de la agroinfiltración;

7C - Protoplastos de *Nicotiana benthamiana* aislados 5 días después de la agroinfiltración. Muchos puntos claros en la imagen derecha indican una frecuencia extremadamente alta de formación de replicón y de expresión GFP.

La Figura 8 es una representación esquemática de un precursor de replicón basado en virus de ARN diseñado de acuerdo con la presente invención, que da nivel de expresión cero del gen de interés (GFP, indicado con G) en el estado no inducido.

P - promotor de transcripción; T - región de terminación de transcripción; SM - gen marcador seleccionable; Ac2 - promotor del gen ACTIN2 de Arabidopsis; RdRp ARN polimerasa dependiente del ARN viral; MP - proteína viral de desplazamiento; NTR - región viral 3' no traducida.

La Figura 9 muestra un perfil de predicción de intrón para el gen AtDMC1 específico de la meiosis de *Arabidopsis thaliana* (Acceso a GenBank N°: U76670), usando la cadena directa (+ cadena). Las regiones de codificación del intrón están rodeadas con un círculo.

La Figura 10 (A y B) muestra la predicción de posibles regiones problemáticas (rodeadas con un círculo) dentro de la cadena directa (+ cadena) del genoma del virus X de la patata (PVX) (Acceso a GenBank N°: AF172259).

Las Figuras 11A, 11B y 11C muestran la predicción de posibles regiones problemáticas (rodeadas con círculo) de la cadena directa (+ cadena) de los genomas de ARN1, (Acceso a GenBank N°: K02703), ARN2 (Acceso a GenBank N°: K02702) y ARN3 (Acceso a GenBank N°: L00163), del virus del mosaico de la alfalfa, respectivamente.

La Figura 12 representa las regiones T-ADN de las construcciones pICH12691 y pICH16888.

P - promotor de transcripción; T - región de terminación de transcripción; SM - gen marcador seleccionable; Ac2 - promotor del gen ACTIN2 Arabidopsis; RdRp ARN polimerasa dependiente del ARN viral; MP - proteína viral de desplazamiento; NTR - región viral 3' no traducida.

La Figura 13 muestra hojas bajo luz UV de diferentes líneas de *N. benthamiana* transformadas de manera estable portadoras de las regiones T-ADN de cualquiera de pICH12691 ó pICH16888. Las hojas se agroinfiltraron con vectores (pICH10881 ó pICH14313) proporcionando integras.

La Figura 14 muestra hojas de *Beta vulgaris* una semana después de la agroinfiltración con pICH18711 a la luz del día (izquierda) y con iluminación UV (derecha). Los parches de luz en la fotografía derecha indican fluorescencia GFP. Los intrones (recuadros punteados) en la construcción que se muestra en la parte inferior están numerados.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que la incorporación de intrones de planta dentro de ciertas regiones de vectores de ARN viral de planta y la eliminación o el reemplazo de los intrones crípticos dentro de las secuencias para la función del replicón pueden aumentar drásticamente (al menos $\times 10^2$ veces) la eficacia de la aparición de los replicones de ARN en el citoplasma de las plantas huéspedes. Este aumento en la eficacia se reflejó en al menos un parámetro medible: la proporción relativa de células que mostraron replicación del vector, por ejemplo, en la frecuencia aumentada de la formación del replicón. Esta optimización del inicio de la formación del replicón de ARN condujo a la capacidad de activación sincronizada de la expresión de una secuencia de interés en una planta completa, dando como resultado una producción drásticamente incrementada de la proteína recombinante de interés en un tiempo menor que para un vector no modificado.

A pesar de las publicaciones concernientes al incremento de la expresión nuclear transgénica por la incorporación de intrones en las regiones de codificación del ADN recombinante (Mascarenhas *et al.*, 1990, *Plant Mol. Biol.*, 15, 913-920; Bourdon *et al.*, 2001, *EMBO Reports*, 2, 394-398; Rose, AB., 2002, *RNA*, 8, 1444-1453; Patente US 5,955,330), no hay indicio en la técnica anterior que muestre que la incorporación de intrones dentro de los replicones de ARN viral tuvieran ningún efecto positivo en la frecuencia de la formación del replicón viral y subsecuentemente, en el nivel de expresión de una secuencia de interés proporcionada por el replicón. Este efecto es sorprendente, considerando

que la transcripción del ARNm nuclear y la replicación del ARN viral tienen lugar en diferentes compartimientos subcelulares. Incluso si la copia del ADNc de un replicón viral se coloca en el núcleo, sólo la primera copia del precursor del replicón viral se produce en el núcleo y luego se amplifica en el citoplasma en condiciones diferentes a las del núcleo. En la técnica anterior, se describió el uso de intrones para prevenir el efecto citotóxico de la expresión “de escape” de los genes virales en *E. coli* durante la clonación con los ADNc de virus tipo silvestre (Johansen, I.E. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12400-12405; Yang *et al.*, 1998, *Arch. Virol.*, 143, 2443-2451; Lopez-Moya & García, 2000, *Virus Res.*, 68, 99-107). No hay indicio de que la inclusión del intrón pueda incrementar la frecuencia de formación del replicón a partir de un clon de ADNc viral. Los resultados obtenidos para los virus de ARN de tipo silvestre y sus copias de ADNc no pueden compararse con los vectores de expresión derivados de virus diseñados para la expresión de una secuencia heteróloga de interés en plantas, predominantemente a expensas de otras propiedades de virus de tipo silvestre como la infectividad y estabilidad de estos virus. La infectividad no es un tema de la presente invención. Precisamente, la infectividad no es un tema en un proceso de expresión de una secuencia de interés en una planta transformada de manera estable. La infectividad de un vector de ADN viral o de su transcrito tampoco es un tema cuando una planta que contiene el vector de ADN en el T-ADN se transforma con Agrobacteria.

La presente invención proporciona un método para incrementar fundamentalmente la frecuencia de formación del replicón derivado de virus de ARN, estos replicones se derivan de la transcripción del precursor de ADN y se diseñan para la expresión de secuencias de interés. Este método supera las limitaciones de los sistemas existentes de expresión basados en vectores viral, tales como la limitación de tamaño para las secuencias heterólogas a expresar y la alta inestabilidad de los vectores. Además, el método ofrece mejores características de bioseguridad, permite diseñar control a prueba de escape sobre la expresión transgénica (nivel cero de expresión en el estado no inducido), ya que este diseño puede ser una parte integrada de la estrategia para el diseño del replicón derivado de virus de ARN. Al proporcionar alta frecuencia de formación de replicón derivado de virus de ARN, el enfoque descrito en este documento permite un rápido inicio de la expresión de una secuencia de interés en una planta completa, parte de planta o cultivo de célula de planta que contenga en el núcleo de la célula un ADN heterólogo que codifique al replicón de ARN. En la realización práctica de la invención, el rendimiento de prácticamente cualquier replicón derivado de virus de ARN diseñado para la expresión de una secuencia heteróloga de interés, puede mejorarse significativamente a través del incremento drástico de la frecuencia de formación del replicón.

Los virus de ARN que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos son adecuados para construir los replicones de ARN de acuerdo con esta invención. Más adelante se presenta una lista de virus de ARN a los que puede aplicarse esta invención. Los nombres de los taxones entre comillas (y no en cursiva) indican que este taxón no tiene un nombre ICTV internacional aprobado. Los nombres de las especies (vernáculos) se dan en letra normal. Se indican los virus sin asignación formal al género o la familia.

Virus de ARN

Virus de ARNmc (monocatenarios): Familia: *Bromoviridae*, Género: *Alfavirus*, Especie tipo: virus del mosaico de la alfalfa, Género: *Ilavirus*, Especie tipo: virus de la raya del tabaco, Género: *Bromovirus*, Especie tipo: virus del mosaico del bromo, Género: *Cucumovirus*, Especie tipo: virus del mosaico del pepino;

Familia: *Closteroviridae*, Género: *Closterovirus*, Especie tipo: virus amarillo de la remolacha, Género: *Crinivirus*, Especie tipo: virus amarillo infeccioso de la lechuga, Familia: *Comoviridae*, Género: *Comovirus*, Especie tipo: virus del mosaico del guisante pinto, Género: *Fabavirus*, Especie tipo: virus 1 marchitador del haba, Género: *Nepovirus*, Especie tipo: virus de mancha de anillo del tabaco;

Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*, Especie tipo: Virus Y de la patata, Género: *Rymovirus*, Especie tipo: virus del mosaico amarillo del ballico;

Familia: *Sequiviridae*, Género: *Sequivirus*, Especie tipo: virus de la mancha amarilla de la chirivía, Género: *Waikavirus*, Especie tipo: virus tungro esférico del arroz; Familia: *Tombusviridae*, Género: *Carmovirus*, Especie tipo: virus jaspeado del clavel, Género: *Dianthovirus*, Especie tipo: virus de mancha de anillo del clavel, Género: *Machlomovirus*, Especie tipo: virus clorótico jaspeado del maíz, Género: *Necrovirus*, Especie tipo: virus de la necrosis del tabaco, Género: *Tombusvirus*, Especie tipo: virus de la atrofia del arbusto de tomate, Géneros no asignados de virus ARNmc, Género: *Capillovirus*, Especie tipo: virus acanalador del tallo del manzano;

Género: *Carlavirus*, Especie tipo: virus latente del clavel, Género: *Enamovirus*, Especie tipo: virus del mosaico enanizante del guisante,

Género: *Furovirus*, Especie tipo: virus del mosaico del trigo portado en el suelo, Género: *Hordeivirus*, Especie tipo: virus rayado del mosaico de la cebada, Género: *Idaeovirus*, Especie tipo: virus achicador del arbusto de frambuesa;

Género: *Luteovirus*, Especie tipo: virus amarillo achicador de la cebada; Género: *Marafivirus*, Especie tipo: virus rayado fino del maíz; Género: *Potexvirus*, Especie tipo: virus X de la papa; Género: *Sobemovirus*, Especie tipo: virus del mosaico de la habichuela del sur, Género: *Tenuivirus*, Especie tipo: virus rayado del arroz,

Género: *Tobamovirus*, Especie tipo: virus del mosaico del tabaco,

Género: *Tobravirus*, *Especie tipo*: virus cascabel del tabaco,

Género: *Trichovirus*, *Especie tipo*: virus de la mancha de hoja clorótica del manzano; Género: *Tymovirus*, *Especie tipo*: virus del mosaico amarillo del nabo; Género: *Umbravirus*, *Especie tipo*: virus jaspeado de la zanahoria; Virus de ARNmc Negativo: Orden: *Mononegavirales*, Familia: *Rhabdoviridae*, Género: *Cytorhabdovirus*, *Especie tipo*: virus necrótico amarillo de la lechuga, Género: *Nucleohabdovirus*, *Especie tipo*: virus amarillo achicador de la patata;

Virus de ARNmc (monocatenario) negativo: Familia: *Bunyaviridae*, Género: *Tospovirus*, *Especie tipo*: virus moteado marchitador del tomate;

Virus ARNbc (bicatenarios): Familia: *Partitiviridae*, Género: *Alphacryptovirus*, *Especie tipo*: virus 1 críptico del trébol blanco, Género: *Betacryptovirus*, *Especie tipo*: virus 2 críptico del trébol blanco, Familia: *Reoviridae*; Género: *Fijivirus*, *Especie tipo*: virus de la enfermedad de Fiji, Género: *Pitorreo virus*, *Especie tipo*: virus de herida de tumor, Género: *Oryzavirus*, *Especie tipo*: virus de la atrofia desigual del arroz;

Virus no asignados:

Genoma: *ARNmc*, *Especie* virus A,B,C,D, del ajo, *Especie* virus de la mancha de la vid, *Especie* virus del mosaico de la línea blanca del maíz, *Especie* virus 2 latente del olivo, *Especie*: virus del melón de Ourmia, *Especie* virus de mancha zonificada del *Pelargonium*.

En la Figura 1 se muestra el principio general de la invención. Se sabe que los virus de ARN de planta (una excepción son los viroides -pequeños ARN no codificantes que amplifican en el núcleo de la célula de la planta- para un repaso, véase Diener T.O., 1999, *Arch. Virol. Suppl.*, 15, 203-220; Flores, R., 2001, *CR Acad. Sci. Ill.*, 324, 943-952) nunca se producen en el núcleo de la planta, sino en el citoplasma. Por lo tanto, las secuencias de los virus de ARN pueden no estar adaptadas para soportar los eventos de procesamiento del ARN nuclear debido a la presencia de motivos que pueden estar implicados en series complejas de etapas del procesamiento, incluyendo el transporte del ARN procesado en el citoplasma, en el que están implicados los precursores pre-ARNm, ARNr y ARNt. Los eventos de procesamiento, tales como la terminación en el extremo 5', el corte y empalme, la generación del extremo 3', la poliadenilación, degradación, la modificación de bases y azúcares, así como la corrección (en plastidios y mitocondrias) se estudian intensivamente. Sin embargo, muchos elementos de esos eventos aún permanecen poco claros. Los cambios más drásticos para el pre-ARNm en el núcleo suceden durante el corte y empalme del pre-ARNm, el proceso por el cual las secuencias de ARN que intervienen (intrones) se eliminan del transcrito inicial y los exones se ligan simultáneamente. El espliceosoma media el corte y empalme, una compleja estructura que comprende partículas pequeñas de ribonucleoproteína ricas en uridilato. El espliceosoma realiza la reacción de corte y empalme en dos etapas consecutivas: la primera -la escisión en el sitio de corte y empalme 5' aguas arriba de la unión exón/intrón que conduce a la formación del bucle, y una segunda etapa -la escisión en el sitio de corte y empalme 3' de la unión intrón/exón aguas abajo seguido por ligamiento de exones aguas arriba y aguas abajo (para repaso ver: Kramer, A., 1996, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 367-409; Simpson, GG. & Filipowicz, W. 1996, *Plant. Mol. Biol.*, 32, 1-41). Los dinucleótidos 5' y 3' del sitio de corte y empalme (5'/GU; AG/3') que flanquean las secuencias intrónicas están muy conservados en plantas superiores y una sola sustitución G podría abandonar la actividad de corte y empalme en el sitio en cuestión lo que sorprende a pesar de una alta conservación de los sitios de corte y empalme entre plantas y animales, los intrones heterólogos en las plantas usualmente no se cortan y empalman o no se cortan y empalman incorrectamente (van Santen, VL. *et al.*, 1987, *Gene*, 56, 253-265; Wiebauer, K., Herrero, J.J., Filipowicz, W. 1988, *Mol. Cel. Biol.*, 8, 2042-2051). Considerando que los ARN virales de planta no estuvieran bajo presión evolutiva para resistir la maquinaria de procesamiento del ARN nuclear, posiblemente estos ARN se someterían mucho a este procesamiento, incluyendo el corte y empalme una vez que están colocados en el ambiente nuclear. Esta situación es completamente diferente de la de los transcritos de ARN codificados por los genes nucleares, ya que los últimos transcritos están adaptados evolutivamente para conservar su funcionalidad, a pesar de las series de modificaciones del ARN que tienen lugar en el núcleo. Sin embargo, esas modificaciones pueden tener consecuencias drásticas para la formación del replicón de ARN viral. La remodelación por ingeniería genética del virus de planta, para hacer vectores de expresión para los genes heterólogos, puede agregar más a la inestabilidad de los replicones basados en virus de ARN, ya que añadiría otros elementos que podrían interaccionar con las secuencias de ARN de origen viral, produciendo ARN defectuoso que sea incapaz de replicar. La invención aborda estos problemas sometiendo al vector de expresión a modificaciones que incrementan significativamente la frecuencia de la formación del replicón de ARN funcional, cuando el vector de expresión se introduce como un precursor de ADN en plantas o células de plantas, para proporcionar la expresión transitoria o la integración estable en el ADN cromosomal de la planta. Se cree que las modificaciones de las secuencias derivadas de virus deben ser la solución más profunda para aumentar la eficacia de los replicones basados en virus de ARN. Esta invención se centró predominantemente en las modificaciones (las diferencias conservadoras de la función) dentro de las secuencias derivadas del virus de ARN de planta, ya que estas son cruciales para aumentar la eficacia de la formación del replicón de ARN.

Sorprendentemente, el primer intento para encontrar pruebas de que existen las regiones potencialmente problemáticas tuvo éxito y, aún más sorprendente, se obtuvo la confirmación experimental al encontrar inesperadamente una mejora de órdenes de magnitud. Un análisis de la secuencia derivada del virus de ARN del vector de expresión pICH8543 (Ejemplo 1, Figura 6A) usando el programa del servidor Netgenell (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) para detectar la presencia de intrones crípticos y sitios de corte y empalme de ARN, mostró la presencia de regiones parecidas a intrones que la maquinaria de procesamiento del ARN nuclear podrían cortar y empalmar (ver las regiones

rodeadas por un círculo en la Fig. 2). Hay muchos otros programas que pueden usarse para identificar las regiones potencialmente problemáticas (las ubicaciones seleccionadas) dentro de las secuencias de ARN viral de planta, tales como el programa de predicción de exón/intrón (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), o el programa de predicción de señal de corte y empalme (<http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/www.spliceview.html>), para diversos organismos.

Considerando que ninguno de los programas existentes son ideales y todos están sujetos a errores, las regiones problemáticas potenciales también pueden determinarse experimentalmente. Esto puede hacerse analizando los transcritos derivados de un vector de ADN sometido a ensayo en un entorno nuclear con la ayuda de técnicas rutinarias tales como la RT-PCR (Frohman, MA., 1989, *Methods Enzymol.*, 218, 340-356) o su versión más avanzada adecuada para la cuantificación exacta de la concentración de diferentes transcritos, denominada PCR en tiempo real (Gibson *et al.*, 1996, *Genome Res.*, 6, 995-1001), preferiblemente seguida por la secuenciación de los productos PCR amplificados. Las diferencias de conservación de la función de la invención cambian drásticamente el perfil del ARN, por ejemplo sustituyendo secuencias de tipo intrón con las de tipo exón, por ejemplo, introduciendo mutaciones silenciosas con sustitución de regiones ricas en A/U (de tipo intrón) con regiones ricas en G/C (de tipo exón) (ver Figura 3, regiones rodeadas con un círculo). Los intrones de las plantas, a diferencia de los exones, son usualmente ricos en A/T (U) (Lorkovic, ZJ. *et al.*, 2000, *Trends Plant Sci.*, 5, 160-167; Brown, JW & Simpson, CG. 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 49, 77-95; Csank, C. *et al.*, 1990, *Nucl. Acid Res.*, 18, 5133-5141; Goodall & Filipowicz, 1989, *Cell*, 58, 473-483), pero hay excepciones, por ejemplo, cuando en las plantas monocotiledóneas se encontraron intrones ricos en G/C (Goodall & Filipowicz, 1989, *Cell*, 58, 473-483; Goodall & Filipowicz, 1991, *EMBOJ.*, 10, 2535-2644). Para la realización práctica de esta invención, las ubicaciones seleccionadas de alto contenido de A/T(U) son segmentos de secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud con un contenido de A/T(U) de al menos el 55%, preferiblemente al menos el 65%, más preferiblemente el 80% o superior, u otros segmentos más cortos ("islas") de 6-19 nucleótidos en una fila de secuencias conteniendo puramente A/T(U). En este documento, las ubicaciones de alto contenido A/U incluyen secuencias que son más ricas en A que en U, secuencias que son ricas en A, secuencias que son más ricas en U que en A, y secuencias que son ricas en U. Adicionalmente, cualquier secuencia transcrita de interés puede ensayarse para las modificaciones pos-transcripcionales que causan un cambio en las secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo corte y empalme de ARN) a través de RT-PCR (Frohman, MA. 1989, *Methods Enzymol.*, 218, 340-356). Para los familiarizados con la técnica el uso de la RT-PCR es una tarea obvia para detectar en el ARN regiones sometidas a modificaciones post-transcripcionales, como delecciones de secuencias del transcrito de ARN original. En el Ejemplo 2 se demuestra que la modificación de la región rica en A/U aumenta al menos 10 veces el número de células que expresan GFP. Esto se demuestra claramente en la Fig. 7 comparando las áreas agroinfiltradas con pICH15466 (vector modificado, Fig. 6A) y pICH14833 (vector de control, Figura 6A). Eliminando la proteína de desplazamiento (MP) se permite un recuento exacto de las células primarias que poseen replicones de ARN funcionales, ya que no se realiza el desplazamiento de célula a célula desde el sitio de infección primario hacia las células circundantes. En el Ejemplo 3, se realizó la modificación de otra región de tipo intrón rica en U que contiene muchos sitios críticos de corte y empalme (Fig. 2B) y que incluye el promotor subgenómico de la proteína de desplazamiento (MP) (Figura 4, rodeada por un círculo). Esta modificación produjo un efecto drástico en el aumento de la frecuencia de formación de replicón a partir del vector viral pICH1590. Como se estableció en los experimentos de recuento de protoplasto (Ejemplo 3), el aumento fue aproximadamente de 100 veces en comparación con el vector pICH14833 no modificado para las dos especies de *Nicotiana* ensayadas - *N. benthamiana* y *N. tabacco* (véanse las áreas infiltradas correspondientes en la Figura 7, A, B). En general, usando los enfoques descritos en esta invención, la frecuencia de formación de replicón de ARN puede aumentarse aproximadamente 300 veces, por ejemplo, aumentando la proporción de células con replicones funcionales desde aproximadamente el 0,2% (vector de control) hasta más de 50% (vector modificado). Se cree que este no es el límite, y que es muy realista el alcanzar una frecuencia del 100%.

Esta alta eficacia de formación del replicón abre la puerta para expresar dos o más genes diferentes a partir de dos replicones de ARN diferentes con la misma célula de planta, por ejemplo, k.o.-expresando genes diferentes usando vectores basados en virus de ARN de planta. El logro de la liberación sincronizada de dos o más replicones al mismo tiempo en la misma célula es crucial para esa co-expresión, ya que el principio "primero en llegar, primero en servirse" es especialmente cierto para los vectores virales. El desplazamiento sistémico o de célula a célula no ayuda, ya que los diferentes vectores virales normalmente no se solapan en sus áreas de distribución, o dicho solapado no es significativo. Cálculos simples demuestran la importancia de la tecnología descrita en esta invención para lograr la co-expresión de dos secuencias de interés en la misma célula de planta a partir de dos replicones. En el caso de un vector viral no optimizado con una frecuencia de formación de replicón funcional de sólo el 0,2% de todas las células, la proporción de células que co-expresan dos genes a partir de dos replicones de ARN diferentes será de $0,2 \times 0,2 = 0,04\%$, mientras que para la construcción con la frecuencia aumentada de formación de replicón de ARN funcional (el 50%, ó 1/2 de todas las células), esa proporción de células será de $0,5 \times 0,5 = 0,25$, por ejemplo, aproximadamente 625 veces mayor. Con algunos de los vectores con mejor rendimiento (por ejemplo, el pICH16191, Fig. 7C), la proporción de células que tiene el replicón funcional alcanza aproximadamente el 90% (Fig. 7C, parte superior derecha). Esto significa que al usar ese vector para expresar dos secuencias de interés diferentes a partir de dos replicones independientes, la co-expresión puede tener lugar aproximadamente en el 80% de todas las células. Parece muy posible que la tecnología pueda mejorarse más y que pueda alcanzarse el 100% de co-expresión.

Cabe señalar que las diferencias de conservación de la función en las secuencias heterólogas de interés a expresar a partir del replicón de ARN también podrían usarse para aumentar la frecuencia de formación del replicón de ARN, particularmente en combinación con diferencias en las secuencias para la función del replicón. Por ejemplo, pueden introducirse dentro de esas secuencias de interés las modificaciones que son necesarias para la formación y/o el procesamiento del replicón.

En una realización importante de esta invención, la frecuencia de formación del replicón se mejora insertando intrones nucleares en las secuencias para la formación del replicón (Ejemplo 4). La incorporación de intrones dentro de la región de codificación de la polimerasa de ARN dependiente del ARN viral (RdRP) (Ejemplos 4 y 8) resultó en un aumento significativo (al menos de 50 veces) en la frecuencia de formación del replicón a partir de (FIGURA 7 A, B) vectores que portaban las diferencias de conservación de la función como se definen en este documento (pICH15034, pICH15025, pICH15499, en la Fig. 6, A, B). El perfil de ARN para un vector que contenía insertados 6 intrones de *Arabidopsis* se muestra en la Fig. 5. En otro ejemplo (Ejemplo 7), la inserción de intrones en las secuencias MP aumenta la frecuencia de formación del replicón al menos 100 veces.

Para llevar a cabo la realización práctica de la invención pueden usarse muchos intrones nucleares. Los ejemplos de esos intrones incluyen, pero sin limitación, los intrones *tpiAct1* del arroz, y los genes *salT* (Rethmeier *et al.*, 1997, *Plant J.*, 12, 895-899; Xu *et al.*, 1994, *Plant Physiol.*, 100, 459-467; McElroy *et al.*, 1990, *Plant Cell*, 2, 163-171); los *Adh1*, *GapA1* del maíz, genes actin y *Bz1* (Callis *et al.*, 1987, *Genes Dev.*, 1, 1183-11200; Donath *et al.*, 1995, *Plant Mol. Biol.*, 28, 667-676; Maas *et al.*, 1991, *Plant Mol. Biol.*, 16, 199-207; Sinibaldi & Mettler, 1992, en WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, vol 42, Academic Press, New York, págs: 229-257), del gen *SSU301* ribisco de la petunia (Dean *et al.*, 1989, *Plant Cell*, 1, 201-208), los genes *A1 EF1 α* , *UBQ10*, *UBQ3*, *PAT1* de *Arabidopsis* (Curie *et al.*, 1993, *Mol. Gen. Genet.* 228, 428-436; Norris *et al.*, 1993, *Plant Mol. Biol.*, 21, 895-906; Rose & Last, 1997, *Plant J.*, 11, 455-464), y muchos otros. También pueden usarse intrones sintéticos para esta invención. Los intrones más pequeños o sus partes que pueden usarse pueden estar limitados para el corte y empalme de los sitios donante y aceptor que usualmente flanquean las secuencias intrónicas internas. Preferiblemente, los intrones deberían tener un tamaño de al menos 50 nucleótidos (nt), más preferiblemente un tamaño de 100 a 200 nt., pero en realidad no hay limitaciones respecto al tamaño de los intrones. Sin embargo, el tamaño de la construcción debería mantenerse adecuado para las manipulaciones. El origen del intrón, su estructura y su tamaño pueden seleccionarse de forma individual dependiendo de la naturaleza del vector. Los experimentos de expresión transitoria pueden usarse para probar la eficacia de un intrón seleccionado o de las correspondientes partes del intrón.

Las modificaciones descritas anteriormente tienen un efecto acumulativo, por ejemplo, si la(s) inserción(es) intrónica se combina con una modificación del promotor subgenómico MP, el incremento en la frecuencia de formación del replicón puede ser de aproximadamente 300 veces (Ejemplo 5). Las regiones preferibles para la inserción del intrón, con objeto de tener un incremento en la frecuencia de formación del replicón de ARN, se denominan en este documento ubicaciones seleccionadas. Esas ubicaciones pueden contener estructuras "de tipo intrón". Esto se confirma con la inserción de intrones en el MP, de hecho en proximidad cercana con una región problemática como el promotor subgenómico MP (Ejemplo 7). Se observó un incremento en 100 veces en la frecuencia de formación del replicón. La inserción de intrones dentro de regiones "de tipo exón" no tiene un efecto tan pronunciado como la inserción en las regiones de tipo intrón (Ejemplo 6).

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron con sistemas de expresión transitoria basados en el suministro del precursor de ADN mediado con *Agrobacterium* dentro de las células de la planta. Sin embargo, la aplicación más útil de esta invención será para las plantas transgénicas con un precursor de ADN del replicón de ARN incorporado de manera estable dentro de un cromosoma nuclear de la planta. Esto permite superar muchas limitaciones de los sistemas basados en el vector viral de planta, tales como las restricciones para el tamaño máximo de las secuencias heterólogas que pueden tolerar los vectores virales. Dado que el precursor de ADN estará presente en cada célula de la planta transgénica, no hay requerimiento absoluto para el desplazamiento sistémico o para el desplazamiento de célula a célula del replicón de ARN (propagación del replicón). Esto puede compensarse con la alta eficacia de formación y transporte de los replicones de ARN de la invención dentro del citoplasma. Sin embargo, la capacidad del vector para el movimiento de célula a célula puede ser de valor adicional, ya que la formación del replicón de ARN no siempre ocurre en todas las células.

Pueden usarse diferentes métodos para proporcionar una célula de planta con el ADN heterólogo. Los vectores pueden transformarse en células de planta a través de un vector Ti de plásmido portado por *Agrobacterium* (documentos US 5,591,616; US 4,940,838; US 5,464,763) o por bombardeo de partículas o microproyectiles (documentos US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). También pueden usarse otros métodos de transformación de la planta tales como microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), electroporación (documentos EP00564595B1; EP00290395B1; WO 08706614A1) o transformación de protoplastos mediada con PEG, etc. La elección del método para suministrar el vector puede depender de la especie de planta a transformar. Por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles se prefiere generalmente para la transformación de monocotiledóneas, mientras que para las dicotiledóneas da por lo general mejores resultados la transformación mediada por *Agrobacterium*.

En los ejemplos descritos más adelante, se usa el suministro de vectores mediado con *Agrobacterium* (dichos ADN heterólogos) dentro de células de *Nicotiana*. Sin embargo, los vectores pueden introducirse en las plantas de acuerdo con cualquiera de las técnicas convencionales adecuadas para la transformación estable o transitoria de la especie de planta de interés. Las técnicas de transformación para las dicotiledóneas son muy conocidas en la técnica e incluyen las técnicas basadas en *Agrobacterium* y las técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas sin *Agrobacterium* implican la captación del material genético exógeno directamente por los protoplastos o las células. Estas técnicas incluyen la captación mediada con PEG o electroporación, el suministro mediado por bombardeo y la microinyección. Los ejemplos de estas técnicas se describen en Paszkowski *et al.*, *EMBO J* 3, 2717-2722 (1984), Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199, 169-177 (1985), Reich *et al.*, *Biotechnology* 4:1001-1004 (1986), y Klein *et al.*, *Nature* 327, 70.73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneran a plantas completas usando técnicas convencionales.

La transformación mediada con *Agrobacterium* es una técnica preferible para la transformación de las dicotiledóneas debido a su alta eficacia de transformación y su amplia utilidad con muchas especies diferentes. Las muchas especies de cultivos que pueden transformarse de manera rutinaria con *Agrobacterium* incluyen tabaco, tomate, girasol, algodón, semilla de colza, patata, frijol de soja, alfalfa y álamo (documentos EP 0 317 511 (algodón), EP 0 249 432 (tomate) WO 87/07299 (*Brassica*), US 4,795,855 (álamo)).

La transformación con *Agrobacterium* implica típicamente la transferencia del vector binario que porta el ADN extraño de interés dentro de una cepa adecuada de *Agrobacterium* que puede depender del complemento de genes *vir* portados por la cepa huésped *Agrobacterium* ya sea en un plásmido co-residente o cromosómicamente (Uknes *et al.*, Plant Cell 5:159-169 (1993). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* puede lograrse por un procedimiento de acoplamiento triparental usando *E. coli* portadora del vector binario recombinante, una cepa auxiliar de *E. coli* que porte un plásmido tal como el pRK2013, que es capaz de movilizar al vector binario recombinante hacia la cepa diana de *Agrobacterium*. Alternativamente, el vector binario recombinante puede transferirse a *Agrobacterium* por transformación del ADN (Höfgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16, 9877 (1988)).

La transformación de la especie diana de planta por *Agrobacterium* recombinante usualmente implica el co-cultivo de *Agrobacterium* con explantes de la planta siguiendo los protocolos conocidos en la técnica. El tejido transformado que porta un marcador de resistencia a un antibiótico o un herbicida presente entre los bordes del T-ADN del plásmido binario puede regenerarse en el medio seleccionable. Esto permite la generación de plantas transgénicas transformadas de manera estable en un cromosoma nuclear con un T-ADN que contenga el ADN heterólogo de la invención.

En los ejemplos de esta invención, en paralelo con la agro-transformación estable, se usa la agro-inoculación, un método de suministro mediado con *Agrobacterium* del T-ADN para la expresión transitoria del gen (o los genes) de interés (Vaquero *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11128-11133). La agro-inoculación es una herramienta extremadamente útil no sólo para los sistemas de producción de pequeña a mediana escala de proteína recombinante, sino como un elemento de un sistema de optimización de vector, que permite obtener resultados rápidos con diferentes variantes de construcciones.

La invención también puede usarse para la producción industrial a gran escala de proteínas recombinantes. En los experimentos se usan cultivos de *Agrobacterium* durante una noche. El cultivo durante una noche se preparó por agro-infiltración, como se describe en la técnica anterior (Marillonnet *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 6853-6857). Usualmente, un cultivo de una noche alcanza una densidad óptica (D.O.) de 3-3,5 unidades a una longitud de onda de 600 nm y se diluye 3-5 veces antes de la agro-infiltración, produciendo en general 5-9 x 10⁹ unidades formadoras de colonias (Turpen *et al.*, 1993, *J. Virol. Methods*, 42, 227-240). Se ha observado que una dilución de 10², preferiblemente de 10³ y más preferiblemente de 10⁴ veces de un cultivo de una noche funciona de modo muy eficaz, especialmente en combinación con secuencias para la función del replicón que tengan las diferencias de conservación de la función como se describe en este documento. Sorprendentemente, los vectores en las hojas de tabaco infiltradas mejoraron más su rendimiento dando una mejor producción de GFP con diluciones crecientes de la *Agrobacterium* transformante. Por ejemplo, una dilución de 10³ veces dio mejor resultado que una dilución de 10² veces. Una dilución de 10² veces proporciona mejor producción de GFP que una dilución de 10 veces. Una posible explicación para este fenómeno es el efecto negativo de la suspensión altamente concentrada de *Agrobacterium* en la función de un vector viral, por ejemplo, en el desplazamiento de célula a célula, posiblemente como resultado de una respuesta de la planta a las altas concentraciones de la bacteria patógena. Este fenómeno es de especial valor para los procesos industriales a gran escala de expresión de la proteína, ya que permite reducir la cantidad de *agrobacteria* necesaria para la producción de la proteína recombinante mediante la agroinfiltración en al menos un orden de magnitud en comparación con los procesos de la técnica anterior.

En el Ejemplo 9 de esta invención, un precursor de ADN de un replicón inactivado basado en ARN viral se incorpora de manera estable en el ADN cromosomal. El replicón se optimiza de acuerdo con la invención. Además, el replicón contiene una estructura que impide la expresión de la secuencia de interés. La expresión, así como la formación del replicón de ARN funcional, puede activarse invirtiendo una parte de la construcción con la ayuda de la recombinación específica del sitio. Esta inversión puede conducir a la formación de dos intrones así como al ensamblaje de una secuencia funcional de interés. El sistema descrito en el Ejemplo 9 no solo muestra la optimización de un vector viral, sino también la solución para evitar el “escape” de construcciones establemente integradas en el ADN cromosomal, incluyendo la expresión “de escape” del gen de interés a partir de esa construcción. En muchas aplicaciones, es crucial tener nivel cero de expresión en el estado no inducido, especialmente para las proteínas citotóxicas o para alcanzar altos estándares de bioseguridad con los sistemas de expresión de planta para expresar proteínas técnicas o farmacéuticas.

La transcripción del ADN heterólogo y/o de la recombinasa puede estar bajo el control de un promotor inducible o de cualquier otro regulable (por ejemplo, regulado en términos del desarrollo). Los promotores inducibles pueden ser divididos en dos categorías de acuerdo con sus condiciones de inducción: los inducidos por factores abióticos (temperatura, luz, sustancias químicas) y los que pueden inducirse por factores bióticos, por ejemplo, ataque de patógenos o plagas. Los ejemplos de la primera categoría son promotores inducibles por calor (documento US 05187287) e inducibles por frío (documento US 05847102), un sistema inducible por cobre (Mett *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 4567-4571), sistemas inducibles por esteroides (Aoyama & Chua, 1997, *Plant J.*, 11, 605-612; McNellis *et al.*, 1998, *Plant J.*, 14, 247-257; documento US 06063985), y sistema inducible por etanol (Caddick *et al.*, 1997, *Nature Biotech.*, 16, 177-180; documento WO 09321334), y un sistema inducible por tetraciclina (Weinmann *et al.*, 1994,

Plant J., 5, 559-569). Uno de los más recientes desarrollos en el área de los sistemas químicamente inducibles para plantas es un promotor quimérico que puede activarse por dexametasona glucocorticoide y desactivarse por tetraciclina (Bohner *et al.*, 1999, *Plant J.*, 19, 87-95). Para un repaso sobre los sistemas químicamente inducibles ver: Zuo y Chua (2000, *Current Opin. Biotechnol.*, 11, 146-151) y Padidam, M (2003, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 169-177). Otros ejemplos de promotores inducibles son los promotores que controlan la expresión de los genes relacionados con la patogénesis (PR) en plantas. Estos promotores pueden inducirse a través del tratamiento de una planta con ácido salicílico y las secuencias de los genes nucleares pre-ARNM de planta (Fig. 9). Esta es una fuerte evidencia que soporta la sugerencia de que, usando los enfoques descritos en esta invención, prácticamente cualquier replicón derivado de virus de ARN de planta puede mejorarse, fundamentalmente eliminando/sustituyendo las regiones problemáticas y/o insertando intrones nucleares.

Esta invención no se limita a los vectores basados en TMV que se describen en los ejemplos 1-9, sino que puede extenderse a los replicones basados en otros virus de ARN de planta. El análisis de otras secuencias de ARN viral de la planta (Ejemplo 10, Figuras 10, 11) muestra ubicaciones seleccionadas muy similares a las descritas para el TVM y las secuencias de los genes nucleares pre-ARNM de planta (Fig. 9). Esta es una fuerte evidencia que soporta la sugerencia de que, usando los enfoques descritos en esta invención, prácticamente cualquier replicón derivado de virus de ARN de planta puede mejorarse, fundamentalmente eliminando/sustituyendo las regiones problemáticas y/o insertando intrones nucleares.

La presente invención se realiza preferiblemente con plantas multicelulares superiores, partes de las mismas o cultivos celulares de las mismas. Las plantas para el uso en esta invención incluyen cualquier especie de planta, dando preferencia a las especies agronómica y horticulturalmente importantes. Las plantas de cultivo comunes para uso en la presente invención incluyen alfalfa, cebada, judías, colza, guisante, algodón, maíz, trébol, loto, lenteja, altramuza, mijo, avena, guisantes, cacahuates, arroz, centeno, trébol dulce, girasol, guisante dulce, semilla de soja, triticale de sorgo, judías de hilo, judía aterciopelada, algarrobo, trigo, glicina y plantas con nuez. Las especies de plantas preferibles para la realización práctica de esta invención incluyen, pero no se restringen a, las representativas de las Gramíneas, las Compuestas, las Solanáceas y las Rosáceas.

Otras especies preferidas para el uso en esta invención son las plantas de los siguientes géneros: *Arabidopsis*, *Agrostis*, *Allium*, *Apium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Bambusa*, *Brassica*, *Bromus*, *Browaalia*, *Camellia*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Cicer*, *Chenopodium*, *Chichorium*, *Citrus*, *Coffea*, *Coix*, *Cucumis*, *Curcubita*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Datura*, *Daucus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Elaeis*, *Eleusine*, *Festuca*, *Fragaria*, *Geranium*, *Glycine*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hevea*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lens*, *Lilium*, *Linum*, *Lolium*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Majorana*, *Malus*, *Mangifera*, *Manihot*, *Medicago*, *Nemesia*, *Nicotiana*, *Onobrychis*, *Oryza*, *Panicum*, *Pelargonium*, *Pennisetum*, *Petunia*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Phleum*, *Poa*, *Prunus*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Ribes*, *Ricinus*, *Rubus*, *Saccharum*, *Salpiglossis*, *Secale*, *Senecio*, *Setaria*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Stenotaphrum*, *Theobroma*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vigna*, *Vitis*, *Zea*, y las *Oliaceae*, las *Pharoidae*, y muchas otras.

Las plantas más preferidas para esta invención son plantas que no entran en la cadena alimenticia animal o humana, como especies de *Nicotiana*, por ejemplo, *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*.

Las proteínas de interés, sus fragmentos (funcionales o no funcionales) y sus derivados artificiales que pueden expresarse en plantas o en células de plantas usando la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enzimas modificadoras de almidón (sintasa de almidón, enzima de fosforilación de almidón, enzima de desramificación, enzima ramificadora del almidón, enzima II ramificado ra de almidón, sintasa de almidón unida a gránulos), sintasa de fosfato de sacarosa, fosforilasa de sacarosa, poligalacturonasa, polifrutano sacarasa, fosforilasa ADP de glucosa, ciclodextrin glucosiltransferasa, fructosil transferasa, glucógeno sintasa, pectin esterasa, aprotinina, avidina, levansucrasa bacteriana, proteína glgA, MAP4 y ortólogos de *E. coli*, enzima del metabolismo/asimilación de nitrógeno, glutamina sintasa, osmotina de planta, albúmina 2S, taumatina, recombinasa/integrasa específica del sitio (FLP, Cre, recombinasa R, Int, Integrasa R SSVI, Integrasa phiC31, o un fragmento activo o variante de la misma), enzimas modificadoras de aceite (como desaturasas de ácidos grasos, elongasas, etc.), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de semilla de soja), toxina de tipo coleopterana o un fragmento insecticida activo, proteínas de fusión de la enzima de conjugación a ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, superóxido dismutasa, forma inactiva de proenzima de una proteasa, toxinas de proteína de planta, características que modifican la fibra en las plantas productoras de fibra, toxina activa de Coleopterana de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt2, proteína de cristal insecticida (ICP), toxina CryIC, endotoxina delta, toxina polipeptídica, protoxina, etc.), toxina AaIT específica de insecto, enzimas de degradación de la celulosa, celulasa E1 de *Acidothermus celluloticus*, enzimas modificadoras de lignina, cinnamoil alcohol deshidrogenada, trehalosa-6-fosfato sintasa, enzimas de la ruta metabólica de la citoquinina, reductasa HMG-CoA, pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, proteína de almacenamiento de semilla, sintasa licopeno de *Erwinia herbicola*, oxidasa ACC, proteína codificada por pTOM36, fitasa, quetohidrolasa, acetoacetil reductasa CoA, sintasa PHB (polihidroxibutanoato), enzimas implicadas en la síntesis de los polihidroxilalcanoatos (PHA), proteína portadora de acilo, napina, EA9, sintasa fitoena de planta no superior, proteína pTOM5 codificada, ETR (receptor de etileno), diquinasa plástica de piruvato fosfato, proteína de poro de membrana inducible por nematodos, características que potencian la función fotosintética o plastidial de la célula de planta, estilbeno sintasa, una enzima capaz de hidroxilar fenoles, catecol dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, antranilato sintasa, proteína AGL15 de *Brassica*, fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), ARN3 de AMV, replicasa PVY, replicasa PLRV, proteína de cubierta de potivirus, proteína de cubierta de CMV, proteína de cubierta de TMV, replicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa mutante germiniviral, C12:0 de *Umbellularia californica*, prefiriendo acil-ACP tioesterasa, C10 ó C12:0 de planta prefiriendo acil-

ACP tioesterasa, C14:0 prefiriendo acil-ACP tioesterasa (luxD), factor A de sintasa de planta, factor B de sintasa de planta, desaturasa D6, proteínas que tengan una actividad enzimática en la biosíntesis y modificaciones de los ácidos grasos, p. ej. la β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos en las células de planta, acil-CoA oxidasa, 3-
 5 quetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA carboxilasa del maíz, etc.; 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP), fosfinotricin acetil transferasa (BAR, PAT), proteína CP4, deaminasa ACC, proteína que tenga sitio de escisión post-traduccional, gen DHPS que confiera resistencia a la sulfonamida, nitrilasa bacteriana, 2,4-D monooxigenasa, acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa (ALS, AHAS), poligalacturonasa, Taq polimerasa, nitrilasa bacteriana, muchas otras enzimas de origen bacteriano o de fagos incluyendo las endonucleasas, metilasas, ligasas de ADN y
 10 ARN, polimerasas de ADN y ARN, transcriptasas inversas, nucleasas (DNasas y RNasas), fosfatasas, transferasas, etc. de restricción.

La presente invención puede usarse para el propósito de cultivo y purificación molecular de proteínas comercialmente valiosas y farmacéuticamente importantes incluyendo enzimas industriales (celulasas, lipasas, proteasas, fitasas, etc.) y proteínas fibrosas (colágeno, proteína de la seda de arañas, etc.). La proteína de la salud humana o animal puede expresarse y purificarse usando el enfoque descrito en esta invención. Los ejemplos de esas proteínas de interés
 15 incluyen, entre otras, las proteínas de respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, receptores de células T, etc.), antígenos incluyendo los derivados de microorganismos patógenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas incluyendo somatotropina (HGH) y proinsulina, citocinas y sus receptores, interferones, factores de crecimiento y factores de coagulación, enzima lisosomal enzimáticamente activa, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación sanguínea, tripsina, tripsinógeno, a1-antitripsina (AAT), albúmina de suero humana, glucocerebrosidasas, toxina B nativa del cólera, trombina, lipasa gástrica humana, factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CMF), serpina, lactoferrina, lisozima, oleosina, protrombina, alfa-galactosidasa, así como proteínas conservadoras de funciones como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas anteriores.

Ejemplos

Para ilustrar la presente invención se presentan los siguientes ejemplos. Pueden hacerse modificaciones y variaciones, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1

35 Construcción de un vector de ARN basado en TMV

Se obtuvieron los ADNc clonados del tobamovirus infeccioso de crucíferas (cr-TMV; Dorokhov *et al.*, 1994, *FEBBS Lett.* 350, 5-8) y del virus aclarador de la vena del nabo (TVCV; Lartey *et al.*, 1994, *Arch. Virol.* 138, 287-298), del Profesor Atabekov de la Universidad de Moscú, Rusia. Se fabricó, en varias etapas de clonación, un vector viral
 40 que contenía una proteína de fluorescencia verde (GFP). La construcción resultante, pICH8543 (Fig. 6A), contiene en orden secuencial: un fragmento de 787 pb (pares de bases) del promotor actina 2 de *Arabidopsis* (ACT2, ref. An *et al.*, 1996, acceso a GenBank AB026654, de 57962 a 58748 pb), el extremo 5' del TCVC (acceso a GenBank BRU03387, de 1 a 5455 pb), un fragmento de cr-TMV (acceso a GenBank Z29370, 5457 a 5677 pb, con timina 5606 cambiada a citosina para eliminar el codón de inicio de la proteína de cubierta, CP), las secuencias "taa tgc ata act cga g", un gen sintético de GFP (sGFP), región 3' no traducida de cr-TMV (3'NTR; acceso a GenBank Z29370, 6078 a 6312 pb), y finalmente el terminador de nopalina sintasa (Nos). El fragmento completo se clonó entre los
 45 bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-ADN del pICBV10, un vector binario derivado del Carb^R pBIN19. El pICH8543 se transformó en la cepa GV3101 de *Agrobacterium* y se infiltró en una hoja de *Nicotiana benthamiana*. Los focos de fluorescencia de GFP que aparecieron a 3 dpi crecieron y se volvieron confluentes. Sorprendentemente, aunque la mayoría de las células en el área infiltrada finalmente expresaron la GFP debido a la replicación viral y al desplazamiento, sólo una fracción de las células iniciaron la replicación, como se detectó mediante varios focos que expresaban GFP independientemente. Resultó claro que el factor limitante no es el suministro de ADN a las células de la planta, dado que la infiltración de las hojas de *Nicotiana benthamiana* con un gen de GFP bajo control del promotor 35S conduce a la expresión de GFP en casi todas las células en el área infiltrada (no mostrado).

Para confirmar esta observación, se fabricó una construcción de vector viral que contenía una mutación en el MP. Esta construcción, denominada pICH14833, es similar al pICH8543 pero difiere por una delección del pb 389 en el gen MP, aguas arriba del sitio EcoRI presente en el MP. La secuencia del fragmento NcoI para EcoRI que incluye esta
 50 delección se proporciona en el anexo como SEC ID N°: 1. Toda la construcción viral (desde el promotor ACT2 hasta el terminador Nos) se clonó entre los bordes izquierdo y derecho del T-ADN del pICBV49, un vector binario Kan^R derivado de pBIN19. Debido a la delección en el MP, los replicones producidos a partir de esta construcción no pueden desplazarse de célula a célula, pero pueden replicarse de manera autónoma dentro de una célula. El desplazamiento de célula a célula puede restablecerse cuando se proporciona MP en trans, por ejemplo, a partir de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Para fabricar una construcción de expresión de MP, el gen TVCV de MP se amplificó por PCR a partir del ADNc del TVCV clonado (acceso a GenBank Z29370, de 4802 a 5628 pb) y se subclonó en un vector binario bajo el control del promotor 35S. La construcción resultante, llamada pICH10745 (no mostrada), y el pICH14833 se transformaron

en la cepa GV3101 de *Agrobacterium* y diversas diluciones de un cultivo durante una la noche se infiltraron en hojas de *Nicotiana benthamiana* como lo describen English y colegas (1997, Plant J., 12, 597-603), excepto en que el medio de infiltración carecía de acetosiringona. La infiltración del pICH14833 solo, condujo a la aparición de unas cuantas células de expresión de GFP dentro del área infiltrada. Al realizar el recuento de los protoplastos preparados

5 procedentes del área infiltrada, se observó que sólo de uno a tres protoplastos expresaban GFP de un total de 500 protoplastos (del 0,2 a 0,6%). La co-infiltración de pICH14833 y pICH10745 condujo a la formación de focos de expresión de la GFP que creció a partir de cada célula inicial de expresión de GFP. Finalmente, debido al desplazamiento de célula a célula, una gran proporción de células en el área infiltrada expresaron GFP (Fig. 7A).

10 Los virus de ARN tales como los tobamovirus se replican en el citoplasma y nunca entran al núcleo. Por lo tanto, han evolucionado en un medio en el que no están expuestos a la maquinaria de procesamiento del pre-ARNm nuclear. Como resultado, no es sorprendente que los transcritos del replicón de ARN generados en el núcleo a partir de las construcciones virales artificiales no puedan reconocerse ni procesarse correctamente por la maquinaria de procesa-

15 miento del ARN. Además, los replicones de ARN procedentes de vectores virales son muy grandes: aproximadamente de 7,000 nt en el caso del replicón basado en TMV. Muy pocos genes de plantas tienen un tamaño tan grande y la mayoría de esos genes que contienen intrones que facilitan el procesamiento de los pre-ARNm, se exportan desde el núcleo, y mejoran la estabilidad de los transcritos procesados. Por lo tanto, se estableció la hipótesis de que las modificaciones de los pre-ARNm que aumentarían la eficacia del procesamiento exacto y de la exportación de los transcritos correctamente procesados desde el núcleo hacia el citosol, conducirían a un aumento del número de células

20 que iniciarían la replicación viral. Resultó que hay dos enfoques que pueden usarse para fabricar vectores basados en virus de ARN que pueden iniciar de modo más eficaz la replicación viral después del suministro de ADN al núcleo: (1) un enfoque es la eliminación de las características de secuencia que pueden inducir eventos de procesamiento no deseados (tales como eventos alternativos de corte y empalme usando sitios crípticos de corte y empalme, o eventos de terminación prematuros); (2) un segundo enfoque es la adición de intrones para aumentar la cantidad de transcritos

25 procesados correctamente, para mejorar la exportación del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma, y/o para mejorar la estabilidad de los transcritos.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

30 *La eliminación de secuencias de tipo intrón aumenta la frecuencia de formación del replicón de ARN viral en el citoplasma*

Se analizó la secuencia del replicón de ARN del pICH4351 usando el programa del servidor Netgenell (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) y se observaron diversas representaciones de secuencias de tipo intrón

35 que podrían inducir eventos alternativos de corte y empalme. Una de esas características es una región de 0,6 kb rica en uridina (correspondiente a los nt 827 a 1462 en el acceso a GenBank BRU03387) al inicio del RdRP (Fig. 2A). Esta región se sustituyó en el pICH14833 por una secuencia mutagenizada por PCR que difiere de la secuencia original por una sustitución del nucleótido 54 (secuencia que se proporciona en el anexo como SEC ID N°: 2; véase la Fig. 3). Las

40 sustituciones del nucleótido 52 se hicieron para reemplazar las secuencias ricas en T por más secuencias ricas en GC. Todas las sustituciones de nucleótidos se hicieron silenciosas para no cambiar la secuencia de la proteína RdRP. Este fragmento mutagenizado también contiene dos sustituciones nucleotídicas (en la posición 829 y en la 1459; coordenadas con respecto al acceso a GenBank BRU03387) que se introdujeron para eliminar los supuestos sitios donantes de corte y empalme crípticos y los del aceptor, respectivamente). Para ensayar el efecto de estas mutaciones, el clon

45 pICH15466 resultante (Fig. 6A) se agroinfiltró en hojas de *N. benthamiana* con o sin el pICH10745 (proteína de desplazamiento en *trans*). Ocho días después de la infiltración, se observó un aumento de 10 veces en el número de células de expresión de GFP en el área infiltrada con el pICH15466 (comparado con el pICH14833, Fig. 7). Esto sugiere que la eliminación de las secuencias de tipo intrón del amplicón viral impide los eventos indeseados de corte y empalme alternativos y da como resultado un inicio más eficaz de la replicación viral. La co-infiltración del pICH15466 y el

50 pICH10745 conduce al desplazamiento de célula a célula del replicón modificado a una velocidad similar a la del replicón no modificado. Esto muestra que la modificación de la secuencia de ARN no afectó el desplazamiento de célula a célula del vector viral.

Ejemplo 3

Eliminación de las secuencias de tipo intrón en el promotor subgenómico de MP

Una segunda región posiblemente problemática corresponde al promotor subgenómico de MP (Fig. 2B). Esta región es muy rica en T y es muy parecida a las secuencias intrónicas. Como consecuencia, se predicen muchos sitios donantes y aceptores de corte y empalme crípticos en las secuencias cercanas a través de programas de predicción de intrones. Por desgracia, en esta región no pueden hacerse fácilmente modificaciones sin afectar la función del promotor subgenómico. Se decidió mutagenizar completamente la región completa sin considerar el promotor subgenómico, y proporcionar MP en *trans* para compensar la pérdida esperada de la expresión de MP. Como la MP no se expresará

60 a partir de esta construcción, también se delecionó la mayoría de la secuencia de MP excepto las secuencias 3' que contenían el promotor subgenómico CP que es necesario para dirigir la expresión del gen de interés. Por lo tanto, se sustituyó un fragmento de 383 pb en el pICH14833 (de 4584 a 5455 pb en el acceso a GenBank BRU03387) por un fragmento mutagenizado de 297 pb (SEC ID N°: 3). La construcción pICH15900 resultante (Fig. 6A) se infiltró en

hojas de *Nicotiana benthamiana* con o sin el pICH10745. De forma interesante, se detectó un fuerte incremento en el número de células que iniciaron la replicación en comparación con las áreas de la hoja infiltradas por el pICH14833. Al realizar el recuento de los protoplastos que expresaban GFP preparados a partir de las áreas infiltradas de la hoja, se estimó que esta modificación da como resultado un aumento de 80 a 100 veces el número de células que iniciaron la replicación viral, en comparación con el pICH14833 no modificado. El pICH15900 se co-infiltró con el pICH10745 (casete de expresión MP de p35S) y se detectó un incremento en la fluorescencia GFP debido al desplazamiento de célula a célula. Este aumento fue sin embargo muy limitado debido a tantas células que ya expresaban GFP aún en ausencia del desplazamiento de célula a célula. Una dilución de 1000 veces (correspondiente aproximadamente a una DO calculada de 0,004 a 600 nm) de la suspensión de agrobacteria que contenía pICH1500 co-infiltrado con una suspensión diluida en 5 veces de agrobacteria que contenía pICH10745 (correspondiente aproximadamente a una OD calculada de 0,8 a 600 nm) dio lugar al focos separados de expresión de GFP. Los focos fluorescentes eran tan brillantes y del mismo tamaño que los focos de control obtenidos con el pICH14833. Esto confirma que la modificación en el pICH15900 y el suministro de MP en trans no compromete la funcionalidad del replicón referente al nivel de replicación, a la expresión del gen de interés y al desplazamiento de célula a célula. Las mismas construcciones (pICH14933 y pICH15900, con o sin el pICH10745) se co-infiltraron a hojas de *Nicotiana tabacum*. Las modificaciones en el pICH15900 condujeron a un incremento similar en el número de células que iniciaron la replicación (en comparación con el pICH14833) del que tuvieron en *N. benthamiana*.

Ejemplo 4

La adición de intrones mejora la frecuencia de formación de replicones de ARN funcionales en el citoplasma

Se ensayó si la adición de intrones dentro de las secuencias del pro-replicón viral incrementaría la frecuencia del inicio de la replicación. Se fabricaron dos construcciones, pICH15025 y pICH15034 (Fig. 6A), cada una conteniendo tres diferentes intrones de *Arabidopsis thaliana* en dos regiones diferentes del RdRP. El pICH15025 se diseñó para contener intrones en el medio del RdRP, mientras que el pICH15034 contiene los intrones en el extremo 3' del RdRP, aguas arriba del promotor subgenómico de MP. Los intrones se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *Arabidopsis* y se incorporaron en las secuencias virales usando PCR con cebadores que solapaban las uniones intrón/exón planeadas. Los fragmentos que contenían los intrones se subclonaron en pICH14833 como un fragmento Aval HindIII (SEC ID N°: 4 en el anexo) para fabricar el pICH15025 o como un fragmento PstI NcoI (SEC ID N°: 5 en el anexo) para fabricar el pICH15034.

Ambas construcciones se agroinfiltraron por separado en hojas de *N. benthamiana* y se compararon con el pICH14833. Ambas construcciones aumentaron de manera significativa el número de células que iniciaron la replicación viral (Fig. 7A). Se estimó que este aumento era del orden de una mejora de 50 veces en relación con el pICH14833. Ambas construcciones también se co-infiltraron con un clon de expresión de MP, y se encontró que el desplazamiento de célula a célula era idéntico al de los clones sin intrones. Ambas construcciones se probaron también en *N. tabacum*, y se observó una mejora similar a la de *N. benthamiana* (Fig. 7B).

Se fabricó un tercer clon, pICH15499, que contenía los 6 intrones (Figuras 5, 6B, 7A, 7B). Esta construcción se ensayó en *N. benthamiana* y en *N. tabacum*. Esta construcción fue más eficaz que cada construcción individual con 3 intrones, pero sin embargo la mejora fue menos que aditiva.

Ejemplo 5

La adición de intrones y la eliminación de secuencias de tipo intrón aumenta la frecuencia de la formación de replicones de ARN funcionales en el citoplasma

Al eliminar características de tipo intrón y añadir intrones adicionales en una construcción se mostró que ambos tipos de modificaciones pueden contribuir a mejorar el inicio de la replicación viral. Se subclonaron los 6 intrones del pICH15499 dentro del pICH15900, que contenía la región mutagenizada del promotor subgenómico de MP. El clon pICH15860 resultante se infiltró en hojas de *N. benthamiana* y se encontró que operaba significativamente mejor que cualquiera de los clones parentales dentro del intervalo de aproximadamente el 50% al 90% de todos los protoplastos que expresaban GFP (Fig. 7). La construcción con mejor rendimiento contenía intrones en la región RdRP y en la región modificada del promotor subgenómico de MP (pICH16191, Fig. 7C). En comparación con un clon sin ninguna modificación, esto representa una mejora de 80 a 300 veces. Esta construcción también se co-infiltró con una construcción de expresión de MP (pICH10745) y se encontró que las modificaciones no comprometían el desplazamiento de célula a célula o la replicación.

Ejemplo 6

No todas las adiciones intrónicas aumentan la frecuencia de la aparición de replicones de ARN funcionales en el citoplasma

Se insertaron dos intrones diferentes de *Arabidopsis* al principio del RdRP, dando como resultado el clon plCH15477 (la secuencia de esta región se muestra como SEC ID N°: 6 en el anexo). La secuencia en esta región ya se ve muy “de tipo intrón” (por ejemplo, rica en GC sin sitios crípticos de corte y empalme) antes de la adición de los intrones. Con esta construcción no se vio mejora en la replicación del inicio viral. Por lo tanto, no cualquier adición de un intrón dará como resultado una mejora del vector viral. Parece que la posición elegida para la inserción del intrón o mutagénesis es un parámetro importante. Por ejemplo, todas las inserciones intrónicas o sustituciones de nucleótidos que se hicieron en las regiones cerca de estructuras problemáticas tales como el promotor subgenómico MP, dieron como resultado grandes mejoras, mientras que las inserciones de los intrones en las secuencias que ya son “de tipo exón” no lo hicieron.

Ejemplo 7

La inserción de intrones en las secuencias MP aumenta la frecuencia de formación del replicón viral

Primero se realizó un cambio de fase en la MP por digestión con la enzima de restricción AvrII, se rellenó y se volvió a ligar. Después, se insertaron dos intrones en la MP. El clon resultante plCH16422 (Fig. 6B) se infiltró en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se detectó un aumento de aproximadamente 100 veces en el número de células que contenían el replicón viral funcional.

Ejemplo 8

La inserción de intrones en vector que contiene MP mejora la frecuencia del inicio de la replicación viral de los clones funcionales autónomos

Se subclonó un fragmento KpnI de EcoRI del plCH15499 en el plCH8543. El clon resultante, 16700 (Fig. 6B), contenía un vector viral completo con 6 intrones en el RdRP. Este clon se infiltró en una hoja de *N. benthamiana* e inició la replicación de manera eficaz. Este clon también puede desplazarse de célula a célula sin la necesidad de proporcionar MP adicional en trans.

Ejemplo 9

Activación de un replicón inactivo integrado de manera estable en un cromosoma

En las plantas transgénicas también es posible transformar de manera estable las construcciones de vectores virales que contiene intrones. Para evitar la replicación viral nociva que inhibiría el crecimiento de la planta, puede fabricarse un clon inactivo (pro-replicón) teniendo una parte del vector presente en orientación antisentido (Fig. 8). La incorporación de los sitios de recombinación y de las secuencias intrónicas en los extremos del fragmento invertido permite que este fragmento se “invierta” en la orientación correcta usando una recombinasa apropiada. Los sitios de recombinación se eliminarán completamente del replicón por corte y empalme. En el pro-replicón los intrones permiten un inicio eficaz de la replicación después de la recombinación y la transcripción. En un ejemplo específico, los sitios de recombinación están localizados dentro del gen de interés y aguas abajo del pro-replicón. Esa configuración impide cualquier expresión del gen antes de la recombinación. Pueden considerarse otras configuraciones en las que los sitios de recombinación estén ubicados en otras áreas del pro-replicón tal como en el RdRP y aguas arriba del promotor. Las secuencias intrónicas en el sitio de recombinación tienen la ventaja de que permiten eliminar por completo el sitio de recombinación del replicón, pero también aumentan la eficacia de la replicación viral, como se ha descrito anteriormente.

La parte invertida puede localizarse en el extremo 3' del vector (como se muestra en la Fig. 8), en el medio o en el extremo 5', como se muestra en la Fig. 12. Se fabricaron dos construcciones, plCH12691 (que contenía sólo un intrón en el sitio de recombinación) y plCH16888 que contenía 6 intrones adicionales en el RdRP. La secuencia de toda la región T-ADN de plCH12691 se proporciona en la SEC ID N°: 7. La construcción plCH16888 es similar a la plCH12691, pero contiene además los tres intrones descritos anteriormente en plCH15025 (SEC ID N°: 4) y los tres intrones descritos en plCH15034 (SEC ID N°: 5) insertados en la misma posición que en esas construcciones, respectivamente. Las dos construcciones plCH12691 y plCH16888 se transformaron de manera estable en *Nicotiana benthamiana* usando selección de Kanamicina de la siguiente manera. Las construcciones plCH12691 y plCH16888 se inmovilizaron por separado en *A. tumefaciens* (GV3101) y se usaron por separado para la transformación de discos foliares mediada con *Agrobacterium* de plantas de *Nicotiana* como describen Horsh y colegas (1985, Science, 227, 1229-1231) con menos modificaciones. Los discos foliares se co-cultivaron durante 30 min en una suspensión agrobacteriana en medio basal Murashige y Skoog (MS) complementado con 1 mg/l de ácido alfa-naftalenoacético (NAA), 0,5 mg/l de 6-benzaminopurina (BAP), 200 microM de acetosirengona (AS), pH 5,5-5,6. Después, los discos

foliares se colocaron en papel filtro estéril Whatman® para eliminar el exceso de líquido y se transfirieron a un medio sólido de co-cultivo (0,8% de agar preparado en MS complementado como se ha descrito anteriormente) durante 48 horas de cultivo en la oscuridad a 22-23°C. Después del co-cultivo, los discos foliares se colocaron en un medio de regeneración selectivo (0,8% de agar preparado en MS complementado con 1 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de NAA, 1 mg/l de MES (pH 5,7-5,8), 300 mg/l de cefataxim, 50 mg/l de kanamicina). Después de 3-6 semanas de cultivo en el medio de regeneración, los brotes regenerados a partir de las células de planta resistentes a kanamicina se transfirieron a un medio de enraizado selectivo (0,8% de agar preparado en MS, complementado con 300 mg/l de cefotaxim, 200 mg/l de timentina para facilitar la eliminación de agrobacterium, 50 mg/l de kanamicina, pH 5,7-5,8). Los transformantes regenerados se transfirieron a un invernadero y se ensayaron por infiltración con una jeringa sin aguja con una suspensión de agrobacterium que contenía una construcción de expresión de integrasa (pICH10881: promotor actina 2-integrasa PhiC31; ó pICH14313: promotor de Spm elemento reversible de Zea maize-integrasa PhiC31). Más transformantes pICH16888 mostraron focos de replicación viral después de la infiltración con la construcción de integrasa que los transformantes del pICH12691 (Fig. 13). Además, los transformantes del pICH16888 mostraron más focos de infiltración viral por infiltración.

Ejemplo 10

Las secuencias de ARN viral de plantas contienen regiones potencialmente inestables

Se realizó el análisis del perfil de ARN de los virus de ARN de planta seleccionados, así como de un gen de planta bien caracterizado (AtDMC1), usando el programa (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) del servidor Netgenell. El perfil de ARN que se muestra en la Fig. 9 para el AtDMC1 refleja claramente la presencia de 14 intrones (rodeados con círculo), previamente identificados comparando las secuencias de ADNc y de ADN genómico. Es obvio que los perfiles de ARN de dos virus de planta tienen regiones (véase las Figuras 10, 11) que pueden causar problemas para la estabilidad del ARN, si se colocan en el medio nuclear de la planta. Se han analizado los perfiles de ARN de otros virus diversos de ARN de plantas representativos (no mostrados), tales como el Virus del Mosaico del Bromo, diferentes cepas del TMV, y muchos otros. Todos ellos tienen posibles regiones problemáticas que pueden comprometer la eficacia de la formación del replicón basado en virus de ARN de planta si se suministran dentro de la célula de planta como precursores de ADN.

Ejemplo 11

Los vectores optimizados funcionan en otras especies

Se fabricó una construcción completamente optimizada que contenía la región mutagenizada (descrita en el pICH15466) y 16 intrones (incluyendo los seis intrones del pICH15860, los dos intrones del pICH16422 y ocho intrones adicionales). En suma, esta construcción contenía los intrones insertados en las siguientes posiciones (proporcionadas en relación con la secuencia TVCV, acceso a GenBank BRU03387): nt 209, nt 828, nt 1169, nt 1378, nt 1622, nt 1844, nt 2228, nt 2589, nt 2944, nt 3143, nt 3381, nt 3672, nt 3850, nt 4299, nt 5287, nt 5444.

Esta construcción se ensayó para la expresión en *Beta vulgaris*. La infiltración de toda la planta se realizó como se describe a continuación. Se inoculó Agrobacteria portadora de pICH18711 a 300 ml de LB que contenía 50 µg/ml de Rifampicina y 50 µg/ml de Kanamicina (selección para el vector binario) y se cultivó hasta la saturación. Las bacterias se sedimentaron a 4800 g durante 10 min y se resuspendieron en 3 l de tampón de infiltración (MES 10 mM, pH 5,5, MgSO₄ 10 mM) para conseguir una dilución de 10 veces con relación al cultivo saturado de Agrobacterium. Un vaso de precipitado conteniendo la solución de infiltración se colocó en un desecador (30 mm de diámetro), con las partes aéreas de una planta sumergidas en la solución. Se aplicó vacío durante dos minutos usando una bomba de tipo PM 16763-860.3 de KNF Neuberger (Freiburg, Alemania), alcanzando desde 0,5 hasta 0,9 bares. Las plantas se llevaron de nuevo al invernadero en condiciones convencionales.

La expresión de GFP fue alta en las hojas de las plantas infiltradas con pICH18711 (Fig. 14). A diferencia, sólo unos cuantos puntos pequeños pudieron observarse en las plantas de control infiltradas con pICH16700 que no contenía intrón (no se muestra).

ES 2 346 224 T3

Anexo

SEC ID N°: 1 (fragmento NcoI-EcoRI del pICH14833):

5 ccatggacaaagtataaaggcagcttttgggagacgatagccctgattacattcctaaggttagactgcctgatattcaggc
gggcgcgaaacctcatgtggaacttcgaggccaaactctcaggaagaagatgggtactctgtggcgttatgtattcaccatgat
10 agaggagccattgtgtattacgatccgcttaaactaataatctaaagttaggttgtaaacataatagagatgtgttcacttagaagagtta
cgcgagtccttggtagatgtagctagtaactaaataattgtgcgtatctttcacagttagatgaggccgttgcgaggttcataagacc
15 gcggtaggcggttcgttcttttagtataattaagtattgtcagataagagattgttagagattgttcttggtagataatgtcgata
gtctcgtagcaacctaagggtgagtgatttctcaatcttcgaagaaggaagagatcttgcgaaggctctaacgagggttagaattc

20 SEC ID N°: 2 (parte del pICH15466):

25 ggagataacctgagcttcttccataatgagagcactctcaattacacccacagcttcagcaacatcatcaagtacgtgtgcaag
acgttctccctgctagtcacgcttcgtgtaccacaaggagttcctggtcactagagtcacacttgggtactgcaagttcacgagag
tggtacgttcactctgttcgtgggtgtgtaccacaacaatgtggattgcgaagagtttacaaggctatggacgatgcgtggcacta
30 caaaaagacgttagcaatgttaatgccgagaggaccatctcaaggataacgctgcgttaaactttgggtcccgaaagtgaga
gacatgggtatcgctccctctcttgacgcttctatcacaactggtaggatgtctaggagagagggtatgggtgaacaaggacttcgtcta
35 cacggtcctaaatcacatcaagacctatcaagctaaggcactgacgtacgcaaacgtgctgagcttcgtggagctctattaggtcta
gagtcataattaacgggtgcactgccaggctgaatgggacacagacaaggcaattctaggtccattagcaatgacattcttcciga
tcacgaagctgggtcatgtgcaagat

40 SEC ID N°: 3 (parte del pICH15900):

45 gcggacgatacgtgatccaccatgatagaggagccattgtgtattacgatccgcttaaactaataatctaaagctcggctgcaagcac
atcagagacgtcgtgcacttagaagagttacgcgagcttctgtgcgacgtagctagtaactgaacaactgcgcctacttctcacag
50 ttagatgaggccgttgcgtgaggtccacaagactgcggtcggaggctccttcggtctgttagcatcatcaataactgtcagacaag
aggctgttcagggacctgttctcgtcgtgagttgacg

ES 2 346 224 T3

SEC ID N°: 4 (parte del pICH15025) (contiene 3 intrones mostrados en cursiva y subrayados):

Cccgagctatactgtacctcgccgaccgattggtactacaglacagaaggcggaggagtccaatcggtgatcttccaaacc
 tctagaagagtcagagaagtaactacaaacgcattatccgagctacagtgcttgagaatctcgactctttgacttagaggcggttaag
 actttatgtcagcagaagaatgtggaccggatagggcagcaaag
gtaaatcctgggtccacacttttacgataaaaacacaagattttaactatgaactgatcaataatcattcctaaaagaccacactttg
tttgtttctaaagtaattttactgttataacag
 gtggctgtagcaatcatgaagtcagaattgacgttgcccttcaagaaacctacagaagaggaaatctcggagtcgctaaaacca
 ggagaggggtcggtgagagcagataaggaagtgtgagcttcaaaaatgatgtccgttcccggtgtgaaaaatctagtgaag
 gtcccggtccggcgatggaatgtgtcctaaggggtgggttgcagaaattggatgtggacattgtgattccatctcaagagtga
 gatgcagttaaaaaggaactatgatgtctgagggtgtacacaggggtctatcaaagttcaacaaatgaagaactacatagattactt
 aagtgcgtcgctggcagctacagctctcaaacctctgcaag
gtaagagggtcaaaagggttccgcaatgatccctctttttgtttctctagtttcaagaatttggtatatgactaactctgagtggtccttg
atgcatatttgtgatgagacaaatgtttgttctatgttttag
 gtgcttagagatgttcacggcggtgacccagagtcacaggagaaatctggagtggtggatgttaggagaggacgttggttacttaa
 acctaatgcgaaaagtcacgcgtgggtgtggcagaagacgccaaccacaagttggttattgtgttactcaactgggatgacgg
 aaagccggttgtgatgagacatggtcaggggtggcggtgtcaagcgattccttgatatattcggatatgggaaaactaagacgct
 cagctcttcagtcctaaatggtgagccaccggagcctaacgccaagtaatttggtcgatggigtcccggtgtggaaaaacga
 aggagattatcgaaaag
gtaagttctgcatttggtatgctccttgcatltaggtgttcgtcgcttccatttccatgaatagctaagatttttctctgcattcattctt
ttgcctcagttctaactgtttgtgtattttgttttaattattgtacag
 gtaaacttctgaagactgatttagtccctgggaaggaagctt

ES 2 346 224 T3

SEC. ID N°: 5 (parte del pICH15034) (contiene 3 intrones que se muestran en cursiva y subrayados):

ctgcag

5 gtaaaaatgtggaatgccagacgatattctttctttgattgtaactttttcctgcaagggtcgataaaatttattttttgglaaaaagggtcgat
aattttttttgagccattatgttaatttcctaattaactgaaccaaaattatataaaccag

10 gtttgcggaaaatttgggtgcaatgatcaaaagaacatgaatgcgcggatttgacagggacaattgacattgaggatactgca
tctcgggtgttgaaaagtttgggattcgtatgttgacaaggaatttagtggaacgaacgaaatgacatgacaagggagagcttc
tccag

15 gtacggacttctcatgaatattatgttgcagattatgttgttaaaacttttggtagataatcgatgcctcctaattgtccatgttttactgg
ttttctacaattaaag

20 gtggcttttgaacaagagtcatacagttgttcagtgagggactttaaacttttggatttgcggcagtagatgagtacaagcat
atgatcaagagtcaccaaagcaaaagttagacttgagtattcaagacgaatatctgcattgcagacgatagctaccattcga
aaaagatcaatgcgattttcgggtcaatgttttcagaacttcagaggatgttactcgaaggattgactcttgaagttctgttctaca
ccagaagacacctgcacaaatagaggacttctttctgacttagactaacccaggcgatggaaattctggaactcgacattc

25 gaagtacgataagtcacaaaacgagttccattgtgctgtagagtacaagatctgggaaaagttaggaattgatgagtggctagct
gaggctctggaacaag

30 gtgagttcctaagttccattttttgtaatccttcaatgttattttaacttttcagatcaacatcaaaaattaggttcaattttcatcaaccaaat
aatattttcatgtatataatag

35 gtcacagaaaaacgaccttgaaagattatacggccgggaatcaaaacatgtctttggtatcaaaggaaaagtggtgatgtgacaa
cctttatiggtaataccatcatcatctgcgcgaigtgttgagctcaatgatcccatgg

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 224 T3

SEC ID N°: 6 (fragmento del plCH15477, que contiene 1 intrón mostrado en cursiva y subrayado):

5 Gtttagttttattgcaacaacaacaacaattacaataacaacaacaatacaaaacaacaacaacatggcacaatttcaac
aaacaattgacatgcaaactctccaagccgctgcgggacgcaacagcttggggaatgattggcatctcgtcggttacgataat
gcagtcgaggagctgaatgctcgtccagacgtcccaag
10 gtaaaacaacatttcattcacatatagaatactttgtcattgagtaggaagaagacacttactactgttgatgaaagtccgccttt
atacttaatacatatttcattcaaaactagatgaattagggtgatgtttatgatatacatggaacattaatctatagggaactg
tttagattagttttgtataataattttccctgtttgatgttag
15 gttcatttctccaaggcagtgctacggaacagacactgattgcaacaaacgcatatccggagttcgagatttcttactcatacgc
aatccgctgtgcactccttggcggaggccttcggtcacttgagttggagtatctcatgatgcaagttccgttcggctctctgacctac
gacatcggcggaaacttcgccgcacactctcaaaggtaattttcttctacticaatttctccaagatccaatttgaagactgat
20 ctatagttaaaattaaictactccattctgttacctcaggtcgcgattacgttcaactgctgcatgc:
gttttagttttattgcaacaacaacaacaattacaataacaacaacaacaatacaaaacaacaacaacatggcacaatttcaac
aaacaattgacatgcaaactctccaagccgctgcgggacgcaacagcttggggaatgattggcatctcgtcggttacgataat
25 gcagtcgaggagctgaatgctcgtccagacgtcccaaggtaaaacaacatttcattcacatatagaatactttgtcattgagtag
gaagaagacacttactactgttgatgaaagtccgcctttatactatactatcattttcatttcaaaactagatgaaattagggtga
gtttatgatgatcatggaacattaatctatagggaactgttttaggttagttttgtataataattttccctgtttgatgttaggttcatttctcc
30 aaggcagtgctacggaacagacactgattgcaacaaacgcatatccggagttcgagatttcttactcatacgcgaatccgctgt
gcactccttggcggaggccttcggtcacttgagttggagtatctcatgatgcaagttccgttcggctctctgacctacgacatcggc
ggaaacttctccgcgaactctcaaaggtaattttcttctacticaatttctccaagatccaalatttgaagactgalctatagttaa
35 aattaatctactccattctgttacctcaggtcgcgattacgttcaactgctgcatgc

SEC ID N°: 7: región T-ADN del plCH12691, en la que los segmentos de la secuencia tienen la siguiente función:

40 Nucleótidos 1 a 25: borde izquierdo (cadena opuesta),
Nucleótidos 86 a 1484: promotor Nos - secuencia de codificación NPTII - terminador Nos (en la cadena opuesta),
45 Nucleótidos 1506 a 1552: sitio de recombinación AttP (cadena opuesta),
Nucleótidos 1553 a 1599: parte 5' del intrón (cadena opuesta),
Nucleótidos 1600 a 2022: extremo 5' de TVCV RdRP (cadena opuesta),
50 Nucleótidos 2023 a 2809; promotor actin 2 de Arabidopsis (cadena opuesta),
Nucleótidos 2836 a 2903: sitio de recombinación AttB,
55 Nucleótidos 2904 a 2959: parte 3' del intrón,
Nucleótidos 2960 a 7991: parte 5' de MP de parte 3' de TVCV RdRP,
Nucleótidos 7992 a 8168: extremo 3' cr-TMV MP,
60 Nucleótidos 8248 a 8967: secuencia de codificación GFP,
Nucleótidos 8961 a 9215: región no traducida 3' de cr-TMV,
65 Nucleótidos 9234 a 9497: terminador Nos,

Nucleótidos 9549 a 9473: borde derecho del T-ADN (cadena opuesta):

45

50

55

60

65

tccctgtgctgaataccagagggcagcttcaacaactcagctgagaaacccgacttgcattgcgacaaaccttccaacagt
gigaattgacgacagcgatggtcactgacacactcgtgtgacttccatagcatattatgata tccctgttgaggagttcggttctgcg
ctactcaggaagaatgtgaaactgttctgttgcggccttccattccatgagaaatgcttctagatgtgatalacagtcacactcgtatga
gattggagctacttccagaaactcgggtgataaattagtttttcttccataalagagagcactcacaatcacccacagtttagtaatat
aataagtagtgtgtgaaacgttcttctcgtctagtcacacgggttgtgtatcataaggagtttttagtactagagtcacacacttggtact
gtaaattacgagagtggtgatactttactcttccgtgtgtgtatccataataatgttgatgagaagagtttacaaggctatggacg
atgctgtggcactacaaaaagacggttagcaatgcttaatgcccagagaggacacttcaaggataacgctgcgtttaaactttgttcc
cgaaagtgaagacatggttatcgttccctctcttgaacgttctatcaacaatggtaggatgtctaggagagagattatggtgaaca
aggattcgtttatcaggttctaataatcacataaaaaacgtatcaagctaaaggcttaactacgcaaatgttctgtccttgttgagtgat
taggtctagagtgataaataacggtgtcactgcccaggtctgaalgggacacagacaaggcaattctaggtccattagcaatgacat
tttccctataacaaagtgggtcaltgtcaggtgaaataatcctgaaaaagttccagaagttcgcagagaaccaccaatgagctg
atttgacaagctctcgcgatgccctgatgggggtattccctcgttcaaggagacgctgtg cggggtgtttgtgaaagtagcag
aacaagccttagagataaagggttcccgagctatactgaccttgcgcacagattggtacta cagtacaagaaggcggaggagti
ccaatcgtgtgatcttccaacacctctagaagagtcagagaagtaactacaacgcattatccgagctatcagtgcttgagaalctcga
ctcttttgacttagaggcggttaagacttta tgcacgcagaagaatgtggacccggatattggcagcaaaagggtgtcgttagcaatcat
gaagtgcagaattgacgttgccttcaagaacacctacagaagaggaaaatctcggagtgcataaaaccaggagaggggctcgtgtg
cagagcataagggaagtgttgagcttacaataatgatgtcctgctccgtgtgtgaaaaatctatgtgaagggttcgtgtcggcgtgatg
gaatgtgtcctaagggtgtgtgtgtgtgcacaaattgatgtgacacactgtctgatttccatctcaagagtgatgaltgacgtttaaagggtg
aaactatgatgtctcgggtgtacacagggtctatcaaggttcaacaaatgaagaactacatagattacttaagtgtcgtcgtggcag
ctacagcttcaaacctctgcacaagggtcttagagatgttcacggcgttgaccagagtcacacggagaaalclggagtggtggatgtt
aggagaggacgctgtgttacttaaacctaatgcgaaaagtcacgcgtgtgggtgtgtgcagagaagacgccaaccaaggtgtgtatt
gtgtactcaacgtgttgatgacggaaagccggttgtgtatgacatgttgcaggtgtgggtgtgtcaagcagattcctgtatataatcgg
ataagggaacaaactaaagacgtcacgtctgtcagtcacaaatgggtgagccacccggagccta acgccaagtaatttgggtcgtatgt
gttcccggtgtgtgaaaaacgaaggagattatcgaaaagglaaactctctgaagacttga ttttagtccctgggaagggaagcttct
aagatgatcatccggagggccaaccaagctgtgtgtgataagagcggataaggacaatgttagaaagggtgttcttctgtatgc
atccttctagaagggtgttaagaggtgtttatcgatgaaggactaatgtctgcatacaggtgtgttaaatcttctacgtcgtctatctca
atgtgacgtcgcataatgtgtatggggacacaaagcaaatccgttcaatttcagagtcgcga acttccgtatccagcgcattttgca
aaactcgtcgtgatgagaaggaggttagaagaggttacgcctcaggtgcccggcgtgatgttacttcttcaacaagaaglatga
cggggcggtgtatgtgtaccagcgcggttagagagatccgtgaaggcagaagtggtgaga ggaagggtgtcattgaaccaat
aaccttaccgttgaggggtaaaatttgaccttcacacaagctgcagaagtgcagttactggagaagggttaacaggaatgtgaaca
ctgtgcacagaggtgtcaagggtgagacgtacgagaagactgtctattgtgcgttcgacatcaa ctcgcttagagatcatatcgatgtc
gtcacctcatgtttgtgtggcgtgacaagacacacaacgtgtgttaaataatcacacgtgtgtgttgacacagatgggtgaatgtgtatt
cagaaatggagaagttgtccaatttcttctgacatgtatagagttgaagcgggtgtccaaatgcaattacagatcgatgcagttat
cagggacagcaactgtttgttcagacgcaccaagtcagaggaatggcagagatgtgtcaatttactatgacgtctcttcccgaaa
cagtlactatctcaatgaattgaatgtctgttaccagtaatttgagggaatttctttaaagctcaaaagattgcagaatcgacttctcaa
alccgtgtcaacttctaagaacaaacttatttccctaagcctaataataagaactgcgcagaaatgccgagaactgcaggtttg
ctggaaaaattgtgtgtcaatgatcaaaaagaacatgaaltgcgcgggatttgacagggaca attgacattgaggatactgcactct
gggtgtgtgaaaaagttgtgtgtatgtgtgtgacaaggaaatttagtggaacgaacgaatga ccatgacaagggaagttttctag
atggcttctgaaaacaagagtcactatcagttgtgtcagttagcggacttacttgttgatttgcgggcagtagatgagtaacagcat
atgatcaagagtcacaaacgaagtaagacttgagatattcaagacgaataatcctgcattgcagacgatagtctaccattcga
aaaagatcaatgcgaatttccgttccaatgttttcagaacttacgaggatgttactcgaaaggatgactcttcgaagttctgttctaca
ccagaagaacacccgtcacaaatagaggactcttttctgacctagactcaaccacggcgatggaaattctggaacitcgacattc
gaagtacgataagtacaaaacagagttcattgtgtcgttagagtaacagatctgtggaaaaa gttaggaaatgatgagtggtctagct
gaggtatggaaacaagggacacagaaaaacgcacttgaagattatcggccggagtcacaaacatgtcttgggtatcaaaagga
aaagtgtgtgatgtgacaaacttattgtgtaaatccatcatcatttgcagccgtgttgagtcattatgcacatggacaagattgataa
ggcagcttcttgttgagacgatagctgttatcatttctaagggttagacttgcctgatattcagggcggtgcogaacctcatgtgtg
aacttgcagggcaacttctcaggaagaagtattgttacttctgtgtgtgtattatcaatgataagagagcagcactgtgtattac
gatccgcttaaaactaatatctaagttatgtgttaaacatattagagatgtgtgtgtattatagaaagatgcagttctgtgtgtg
ctagtaacttaataaattgtgcgtatttttcaagttagagagcgggtgtccgaggttcaatgaagacgcggtaggcgtgtgtgtgtgt
ttgtagtaataaattgtgtgcagataagagattgttttagagattgttcttgtgttaaalgtogatagtctgtacgaacctaagggtg
agtgtatttctcaacttctgagaagaagggaagagatctgtccgaaggcttcaacagggtaaaaaacgtgtctattagtactaaagat
attatattctgaaggaggtggagacttgtgtgtatagattgtttaaaltgtgtccattatagataaggtatagataatgtgtgtatctag
gagcttctttaaaccggagaggtggcaggtgtccagacttctttaaagggtggagtgacataaggtgtgatagataagcgtctgtgtgaact

ES 2 346 224 T3

caaaaggagtgctgattggtatgctacagagccgcagccaagagtaagaggttcagttcaaatgtgtccaataactctgtgtctccgtgagcgcaaaaggagagccgtggcagggttcattgttctgtatcaagaactgaagattgagcgcggttggcagccgttagctctggaagtagtttcagttgctatgttcaccaataacgttgtcatgaagggttggagggaaaaggctgctgcgaataaagtatccggagtgctgaagggttgaagggtgtggtgacgaattctgctgattcgggtgcagcattaaagcgggtgacaactttaaaagaaggaaaaaagaggttgaagaaaagggtgtagtaagtaaglaagtaagtacagaccggagaagtacgcgggtctctgattcgtttaatttgaaagaa gaaaacgtcttacaacattacaacccgaataatcgtataactgcaglatttttacaacaattaccaacaacaacaacaacaacattacaattacattacaattatcatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtgtgtgccatctgtgtcagctgtgacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggtgcgagggcgagggcgatgccacctacggcgaagctgacctgaagttcatctgaccaccggcgaagctgtcccggtccctgtgccaccctcgtgaccacctcagctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccatgaagcagcagcacttctcaagtcggcgaatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcggaggtgaagttcgagggcgacacctgtgtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgactcaaggaggagcggaacatctctggggcacaagctggagtacaactacaacagccaacacgtctatatcatgtgccgacaagcagaagaacggcatcaagggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgtccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgtgtcccgacaaccactacctgagcaccagctccgccctgagcaagaccccaacgagaagcgcgatcatatggtctctgtgaggttcgtgacccgcgcgggacactcacggcatggacgagctgtacaagtaaagcggccccctagagcgtgtgtgcacgatagcgcgatagtgttttctctccacttgaaatcgaagagatagacttacgggtgtaaa tccgtaggggtgtgctgaaccaaatcgcgaatgtttgggttcatttaaatacgaacccccctatttcciggtacacctgttaacgcacgtttgacgtgtattacagttgggaatgaataagtgagaggttcgaatctccttaacccccgggtagggggccagcgcgcgtctagttagtagtcaagcagatcgaatcaaacatttggcaataaagttcttaagattgaatgcgtgtgcggtctgcgtagtatcatatataattctgtgaattacgttaagcatgtlaaataataacatgtaatgcagctgtatttatgagatcggtgttttatgattagatgccgcaattatacattlaatacgcgatagaaaaacaaaatatagcgcgcgaactaggataaatacgcgcgcgggtgtcatctatgttactagatc gaccagcttagatcagattgtcgtttcccgccctcagtttaaacatcagtggttgacaggatataattggcgggttaaac

REIVINDICACIONES

1. Una planta, parte de planta o cultivo de células de planta, transformada de manera estable, que contiene en el
5 núcleo de la célula un ADN heterólogo que tiene una secuencia que codifica un replicón de ARN unido operativamente a un promotor de la transcripción,
- en el que la secuencia que codifica un replicón de ARN contiene:
- 10 (i) secuencias para la función de replicón del replicón de ARN, codificando dichas secuencias una ARN polimerasa dependiente de ARN y derivándose de una secuencia de virus de ARN de planta, y
- (ii) una secuencia de interés para expresarse a partir de ese replicón de ARN,
- 15 comprendiendo dichas secuencias, para la función de replicón, cerca o dentro de ubicaciones ricas en A/U de dichas secuencias para la función del replicón, la inserción de uno o más intrones nucleares, siendo las ubicaciones ricas en A/U segmentos de secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud con al menos el 55% de contenido en A/U o segmentos de secuencia de 6-19 nucleótidos en una hilera de secuencias que únicamente contienen A/U.
- 20 2. Una planta, parte de planta o cultivo de células de planta de acuerdo con la reivindicación 1, en la que todos los núcleos de las células de la planta contienen dicho ADN heterólogo.
3. Una planta, parte de planta o cultivo de células de planta de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho
25 ADN heterólogo está incluido en un cromosoma de dichos núcleos de las células.
4. Una planta, parte de planta o cultivo de células de planta de acuerdo con la reivindicación 3, en la que todas las células de dicha planta, parte de planta o cultivo de células de planta contienen dicho AN heterólogo en un cromosoma nuclear.
- 30 5. Una planta, parte de planta o cultivo de células de planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho virus de ARN de planta es un tobamovirus, preferiblemente un virus del mosaico del tabaco.
6. La parte de la planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha parte de la
35 planta es una semilla.
7. Un proceso para expresar una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de célula de planta, que comprende,
- 40 (a) proporcionar una planta, parte de planta o un cultivo de célula de planta que contiene en los núcleos de las células, un ADN heterólogo que tiene una secuencia que codifica un replicón unido operativamente a un promotor de la transcripción,
- en el que dicha secuencia codifica un replicón de ARN que contiene
- 45 (i) secuencias para la función de replicón de dicho replicón de ARN, codificando estas secuencias una ARN polimerasa dependiente de ARN y derivándose de una secuencia de un virus de ARN de planta,
- (ii) una secuencia de interés,
- 50 comprendiendo dichas secuencias de interés para la función de replicón, cerca o dentro de las ubicaciones ricas en A/U de dichas secuencias para la función del replicón, la inserción de uno o más intrones nucleares, siendo las ubicaciones ricas en A/U segmentos de secuencia que tienen una longitud de al menos 20 nucleótidos con un contenido en A/U de al menos el 55% o segmentos de secuencia de 6 a 19 nucleótidos en una hilera de secuencias que únicamente
55 contienen A/U; y
- (b) causar la expresión de dicha secuencia de interés.
- 60 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho ADN heterólogo se incorpora de manera estable en un cromosoma nuclear.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que dicha secuencia de interés codifica una proteína de interés y la etapa (b) comprende causar la expresión de dicha proteína de interés.
- 65 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha expresión de dicha proteína de interés conduce a la producción de un producto deseado en dicha planta, parte de planta o células de planta.

ES 2 346 224 T3

11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicha secuencia que codifica un replicón de ARN tiene dos o más segmentos que codifican juntos dicho replicón de ARN y la etapa (b) comprende la transposición de dichos segmentos de manera que dicho replicón de ADN pueda formarse, en el que uno de dichos segmentos está flanqueado por sitios de recombinación y dicha transposición comprende una recombinación específica de sitio por una recombinasa.
12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (b) comprende proporcionar una recombinasa específica de sitio a dicha planta, parte de planta o cultivo de células de planta.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la recombinasa específica de sitio se proporciona por transfección transitoria con un vector que codifica dicha recombinasa.
14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la recombinasa específica de sitio se codifica de manera estable en un cromosoma nuclear bajo el control de un promotor regulado y la etapa (b) comprende inducir dicho promotor regulado.
15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicha recombinasa se selecciona del grupo constituido por: CRE, flipasa, resolvasa, FLP, integrasa codificada por SSV1, R recombinasa, integrasa phiC31, integrasa Inti, recombinasa phi 80, P22, 186 y P4, resolvasa Tn3, la recombinasa Hin, la recombinasa Cin, recombinasas xerC y xerD de *E. coli*, recombinasa de *Bacillus thuringiensis*.
16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que dicha recombinasa se forma dentro de células de planta a partir de fragmentos no funcionales de dicha recombinasa por interacción de afinidad.
17. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que dicha recombinasa se forma dentro de las células de la planta a partir de fragmentos no funcionales de dicha recombinasa, por trans-corte y empalme de la proteína mediada por inteiña.
18. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en el que dicho ADN heterólogo o dicha secuencia que codifica al replicón de ARN, está unido a un promotor de la transcripción regulado.
19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho promotor regulado es un promotor químicamente inducible.
20. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, en el que dicha provisión de la etapa (a) comprende la transformación de una planta, parte de planta o células de planta con una molécula de ácido nucleico que contenga el ADN heterólogo.
21. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 20, en el que dicha provisión de la etapa (a) comprende la transformación transitoria de una planta, parte de planta o células de planta con una molécula de ácido nucleico que contenga el ADN heterólogo.
22. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 21, en el que la etapa (a) se realiza por transformación mediada con *Agrobacterium*.
23. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 22, en el que la etapa (a) comprende generar una planta transgénica transformada de manera estable con el ADN heterólogo.
24. Un proceso de producción de una planta transgénica transformada de manera estable en un cromosoma nuclear con un ADN heterólogo como se define en la reivindicación 1, que comprende transformar una planta o una parte de planta con un vector que contenga el ADN heterólogo, seleccionar el tejido de la planta que contenga en un cromosoma nuclear el ADN heterólogo, y regenerar una planta transgénica a partir de ese tejido.
25. Un proceso para expresar transitoriamente una secuencia de interés en una planta, parte de planta o cultivo de células de planta, que comprende:
- transformar una planta, parte de planta o cultivo de células de planta con un ADN heterólogo que tenga una secuencia que codifique un replicón de ARN unido operativamente a un promotor de la transcripción,
- en el que la secuencia que codifica un replicón de ARN contiene:
- (i) secuencias para la función de replicón de dicho replicón de ARN, codificando dichas secuencias una ARN polimerasa dependiente de ARN y derivándose de una secuencia de un virus de ARN de planta,
- (ii) una secuencia de interés;
- en el que dichas secuencias para la función de replicón comprenden, cerca o dentro de ubicaciones de dichas secuencias ricas en A/U para la función de replicón la inserción de uno o más intrones nucleares, en el que dichas

ES 2 346 224 T3

ubicaciones rucas en A/U son segmentos de secuencia de al menos 20 nucleótidos de longitud con al menos el 55% de contenido en A/U o segmentos de secuencia de 6 a 19 nucleótidos en una hilera de secuencias que contienen únicamente A/U.

5

26. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la transformación se realiza por transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* del T-ADN que contiene dicho ADN heterólogo.

10

27. El proceso de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en el que la transformación se realiza agroinfiltrando el tallo y/o todas las hojas de plantas de *Nicotiana tabacum*.

28. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 27, en el que todos los núcleos de las células contienen dicho ADN heterólogo.

15

29. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 28, en el que dicha ubicación se localiza por

20

(A) transformar una planta, parte de planta o cultivo de células de planta con un ADN heterólogo como se define en la reivindicación 7, pero que carece de dicha inserción en uno o más intrones

(B) realizar RT-PCR en el ARN derivado de dicha planta, parte de planta o cultivo de células de planta a partir de dicho ADN heterólogo de la etapa (A) y secuenciar el producto de dicha RT-PCR, y

25

(C) identificar en la secuencia del producto de la RT-PCR, una ubicación seleccionada como un evento de corte y empalme no deseado que conduce a productos de corte y empalme no deseados.

30

30. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 29, en el que dicho virus de ARN de planta es un tobamovirus, preferiblemente un virus del mosaico del tabaco.

30

31. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 29, en el que dicha planta, parte de planta o cultivo de células de planta contiene dos o más ADN heterólogos diferentes y dicho proceso comprende la formación de dos replicones diferentes de ARN a partir de los cuales se co-expresan dos proteínas de interés diferentes.

35

32. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 31, en el que dicha planta, parte de planta o cultivo de células de planta se proporciona con dos ADN diferentes heterólogos como se define en la reivindicación 7, en el que se expresan dos secuencias de interés diferentes.

40

33. Una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN que codifica un replicón de ARN unido operativamente a un promotor de la transcripción,

en el que dicha secuencia que codifica un replicón d ARN contiene:

45

(i) secuencias para la función de replicón del replicón de ARN, codificando dichas secuencias una ARN polimerasa dependiente de ARN y derivándose de una secuencia de un virus de ARN de planta

50

(ii) una secuencia de interés para expresarse a partir del dicho replicón de ARN; en el que dichas secuencias para la función de replicón corresponden a secuencias de dicho virus de ARN de planta y comprenden, cerca o dentro de las ubicaciones ricas en A/U de dichas secuencias de dicho virus de ARN de planta, la inserción de uno o más intrones nucleares, siendo las localizaciones ricas en A/U segmentos de secuencia que tienen una longitud de al menos 20 nucleótidos con al menos el 55% de contenido en A/U o segmentos de secuencia de 6 a 19 nucleótidos en una hilera de secuencias que únicamente contienen A/U;

55

en el que la secuencia de ADN que codifica un replicón de ARN está unida operativamente al promotor de la transcripción por

60

(a) una separación de dicha secuencia de ADN que codifica un replicón de ARN y del promotor, por un bloque de secuencia que impide el enlace operativo entre el promotor y dicha secuencia de ADN, estando dicho bloque de secuencia flanqueado por sitios de recombinación, pudiendo cortar dicho bloque una recombinasa que reconoce dichos sitios de recombinación; o

65

(b) tener una parte de una secuencia necesaria para la transcripción, seleccionada de un promotor y de una parte del promotor, en orientación invertida y flanqueada por sitios de recombinación, pudiendo una recombinasa invertir de nuevo dicha parte de una secuencia a la posición correcta.

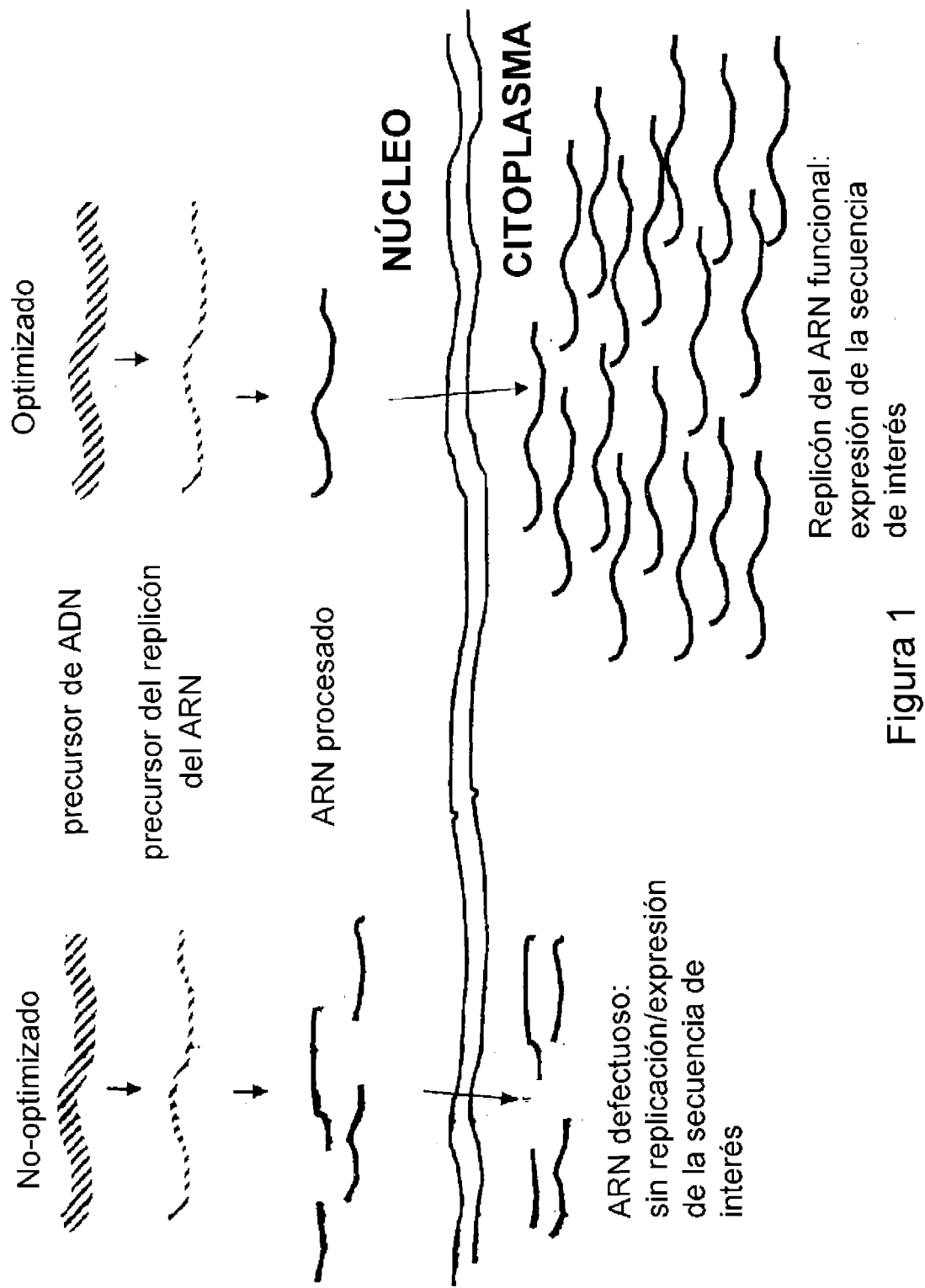


Figura 1

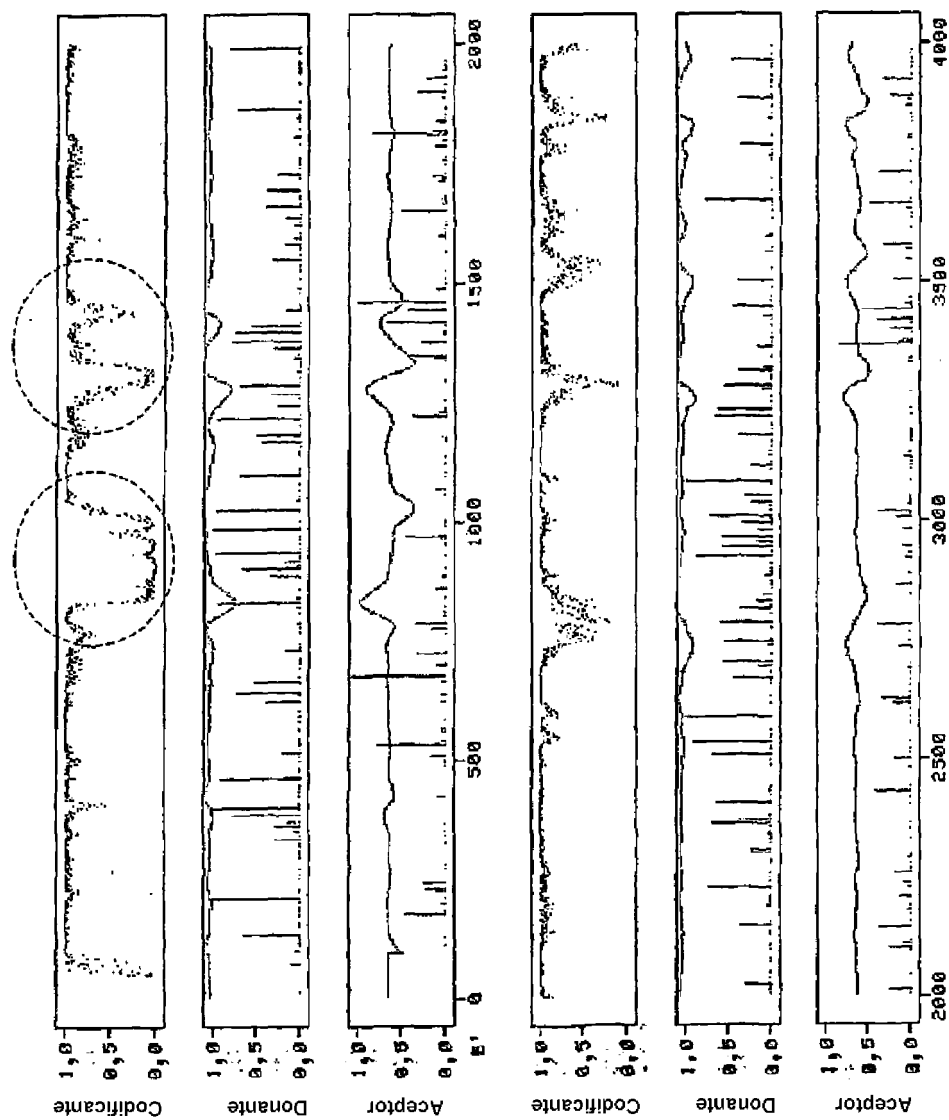


Fig. 2A

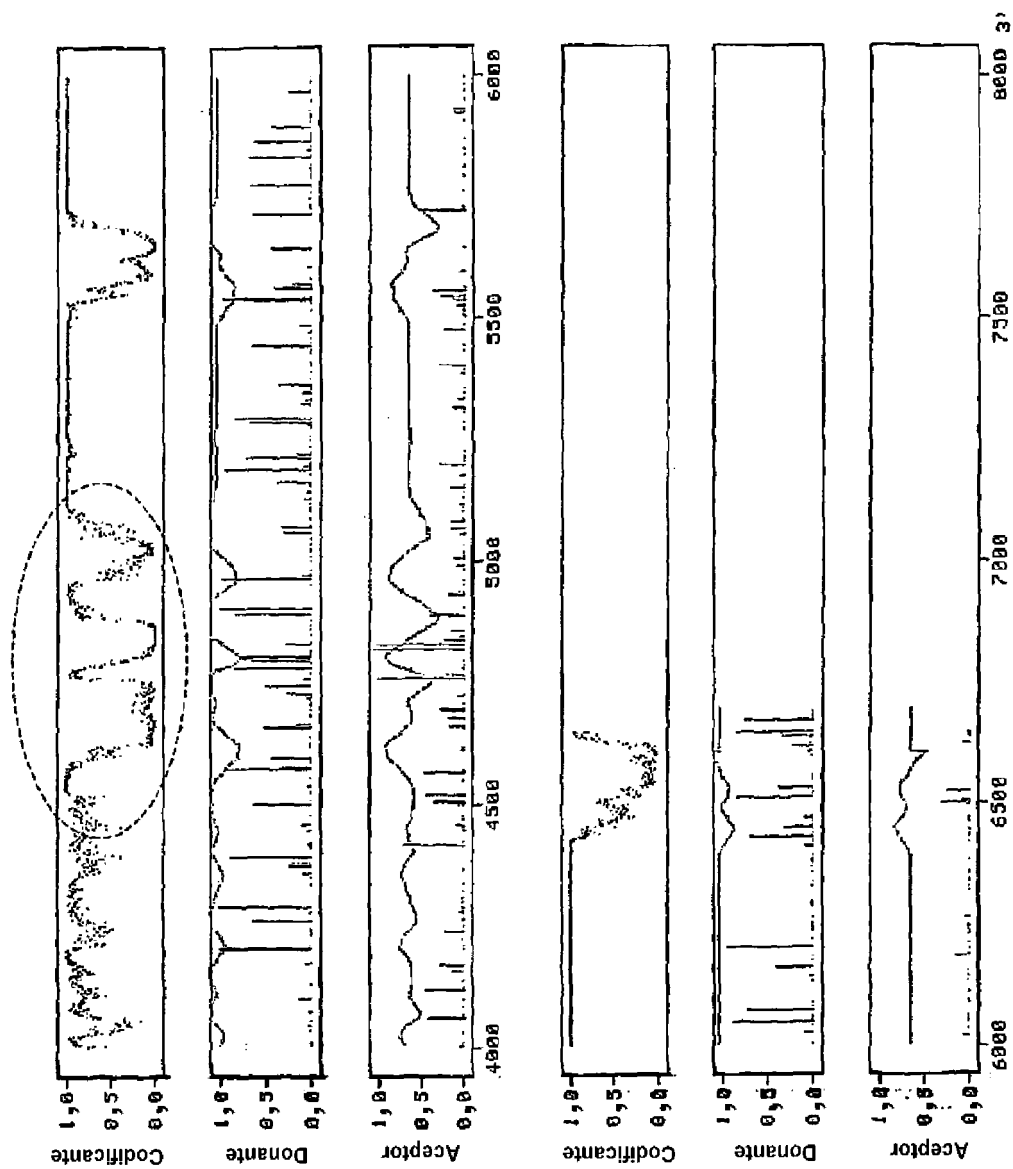


Fig. 2B

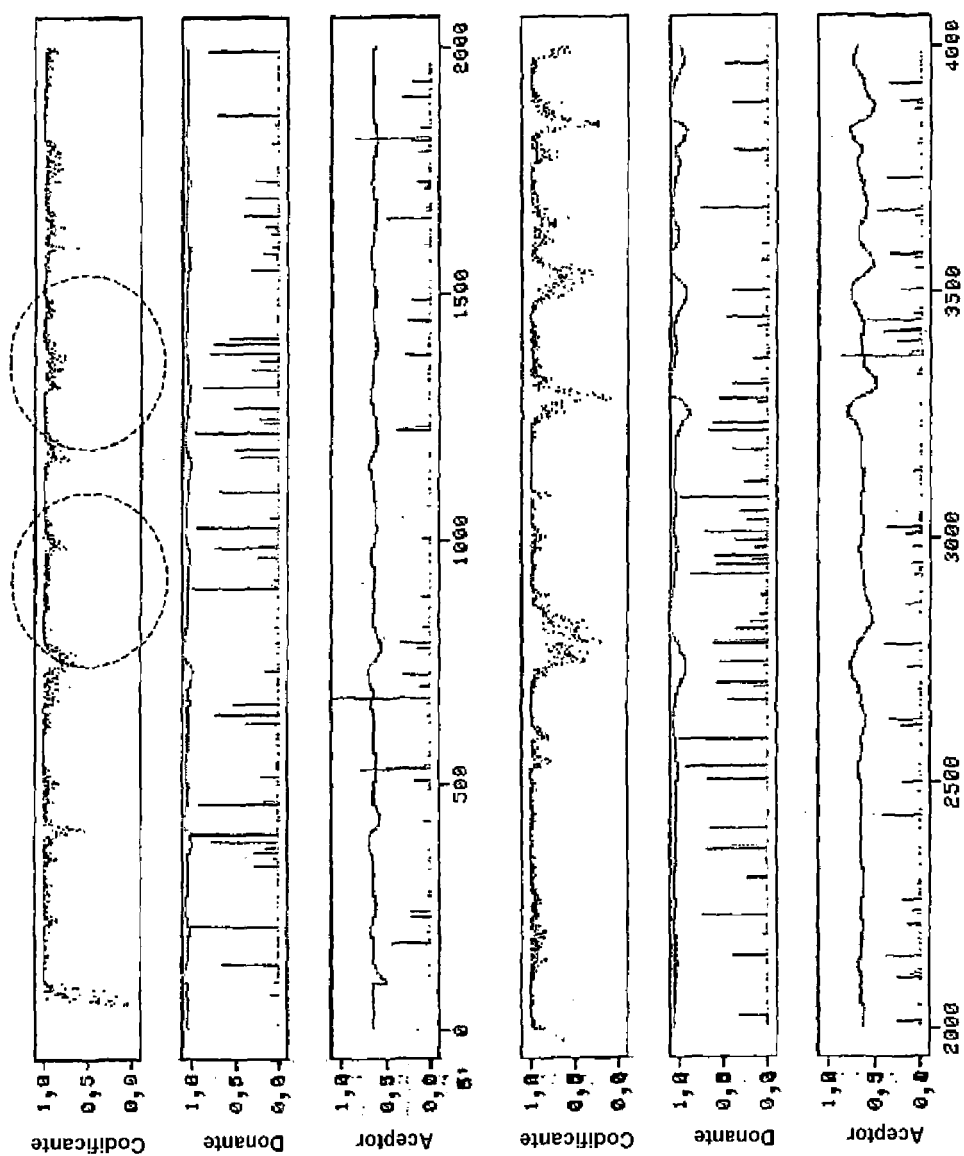


Fig. 3

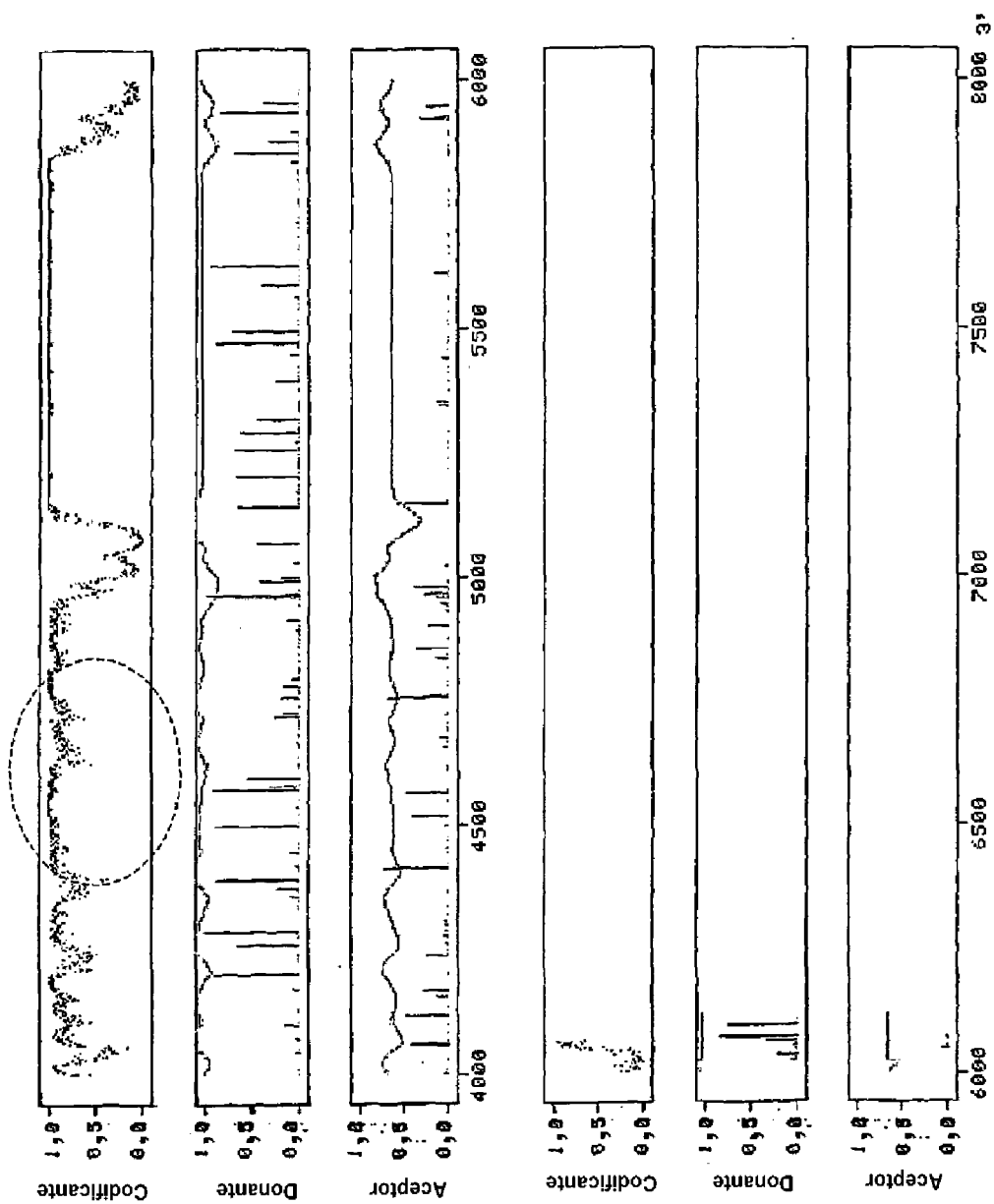


Fig. 4

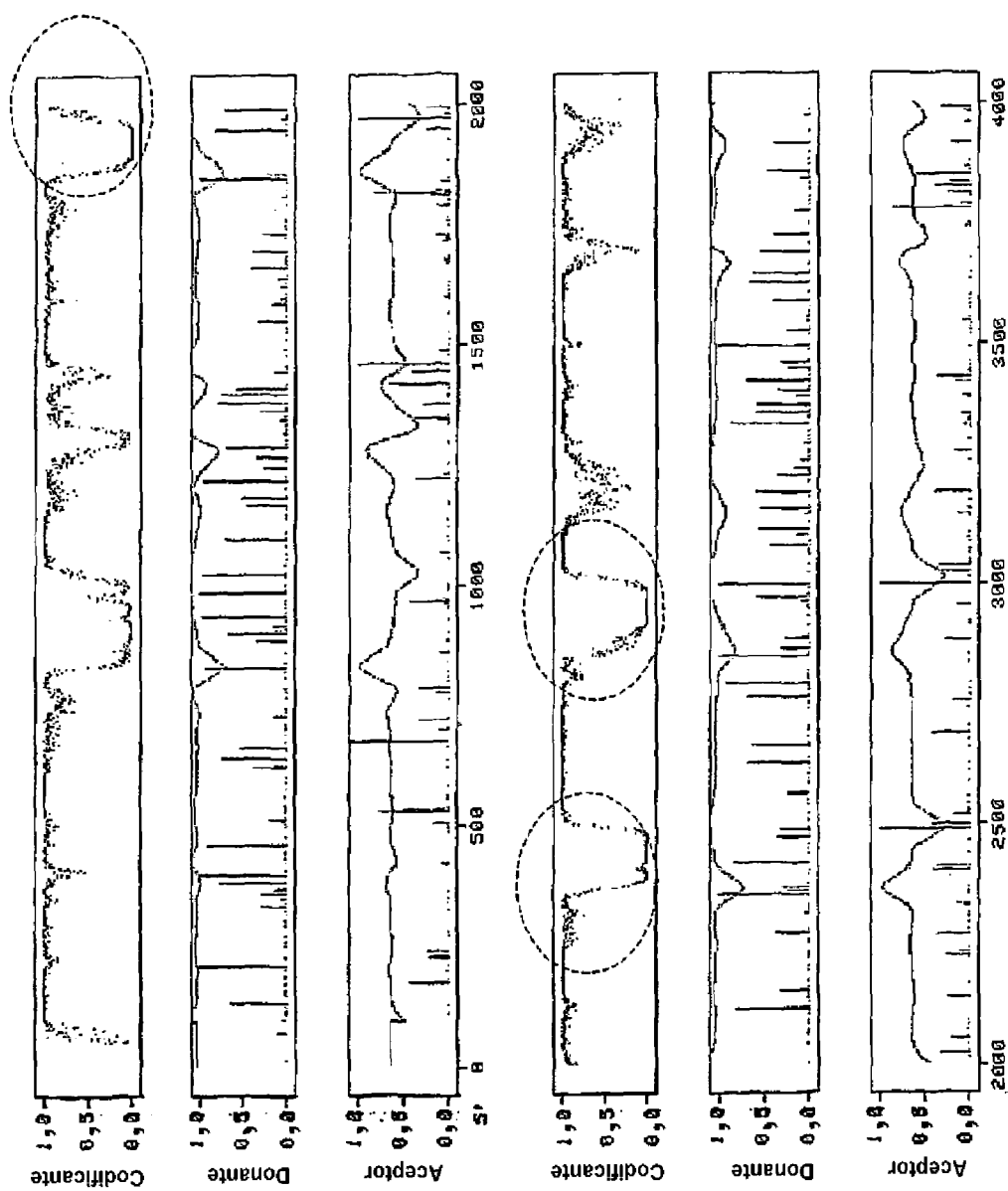


Fig. 5A

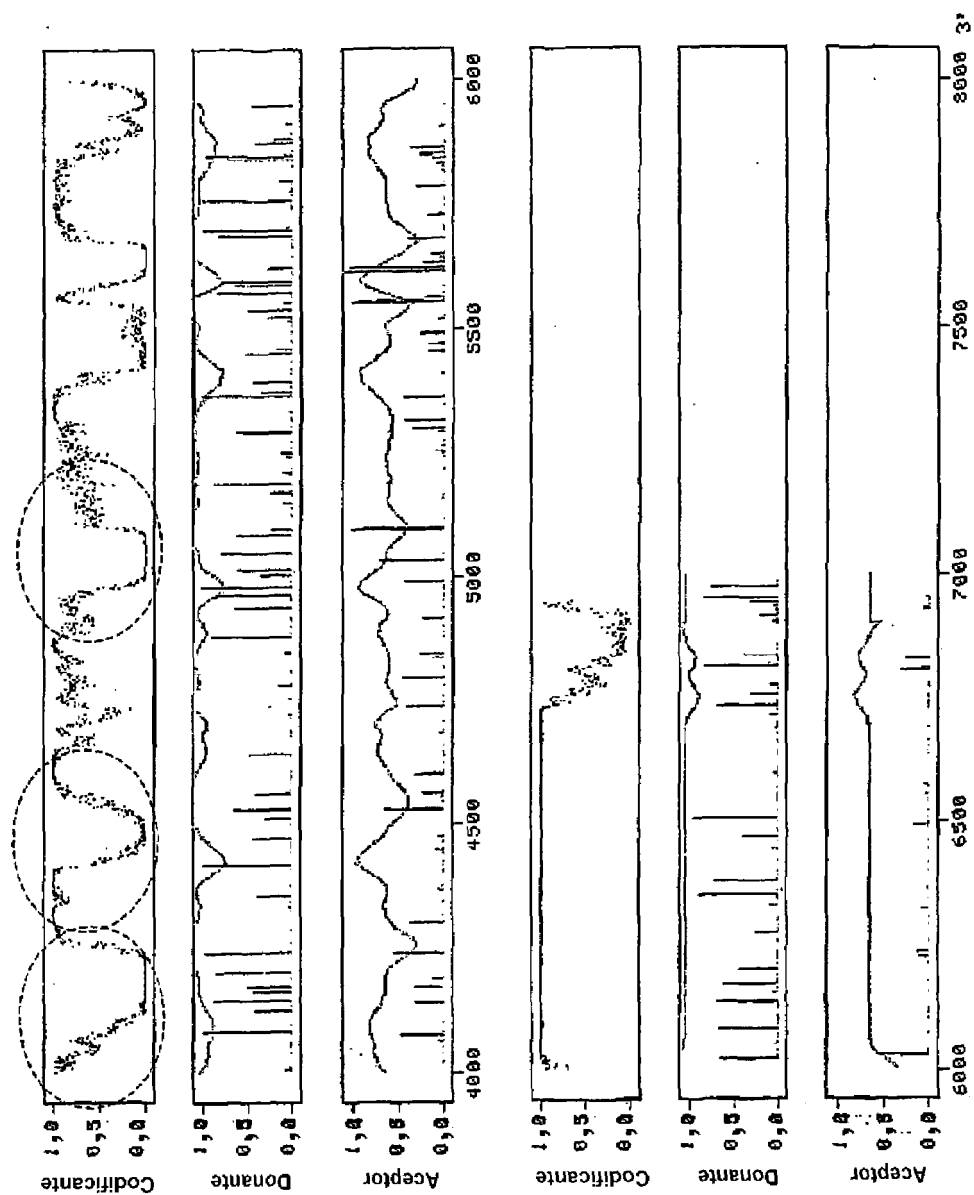


Fig. 5B

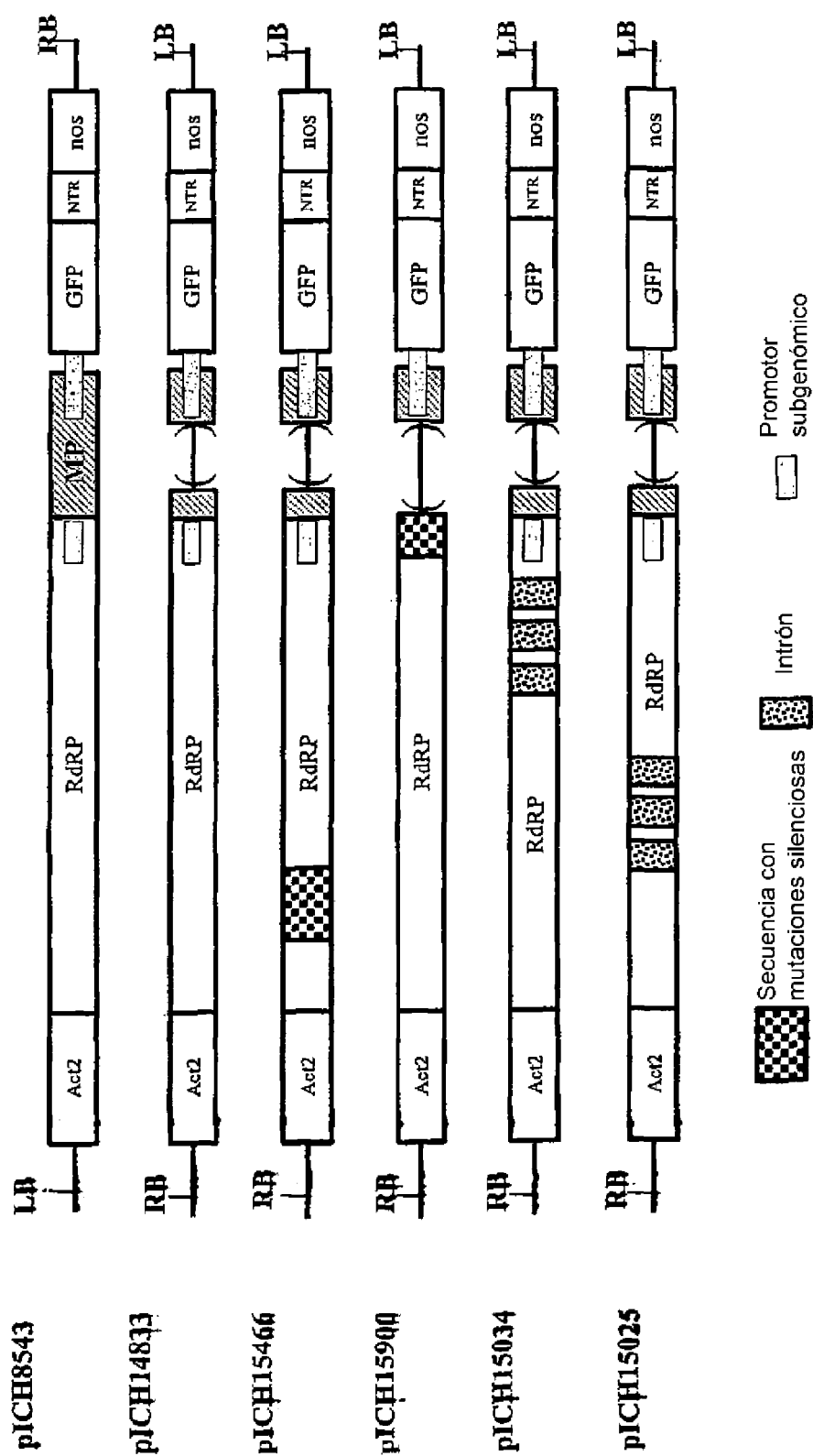


Fig. 6A

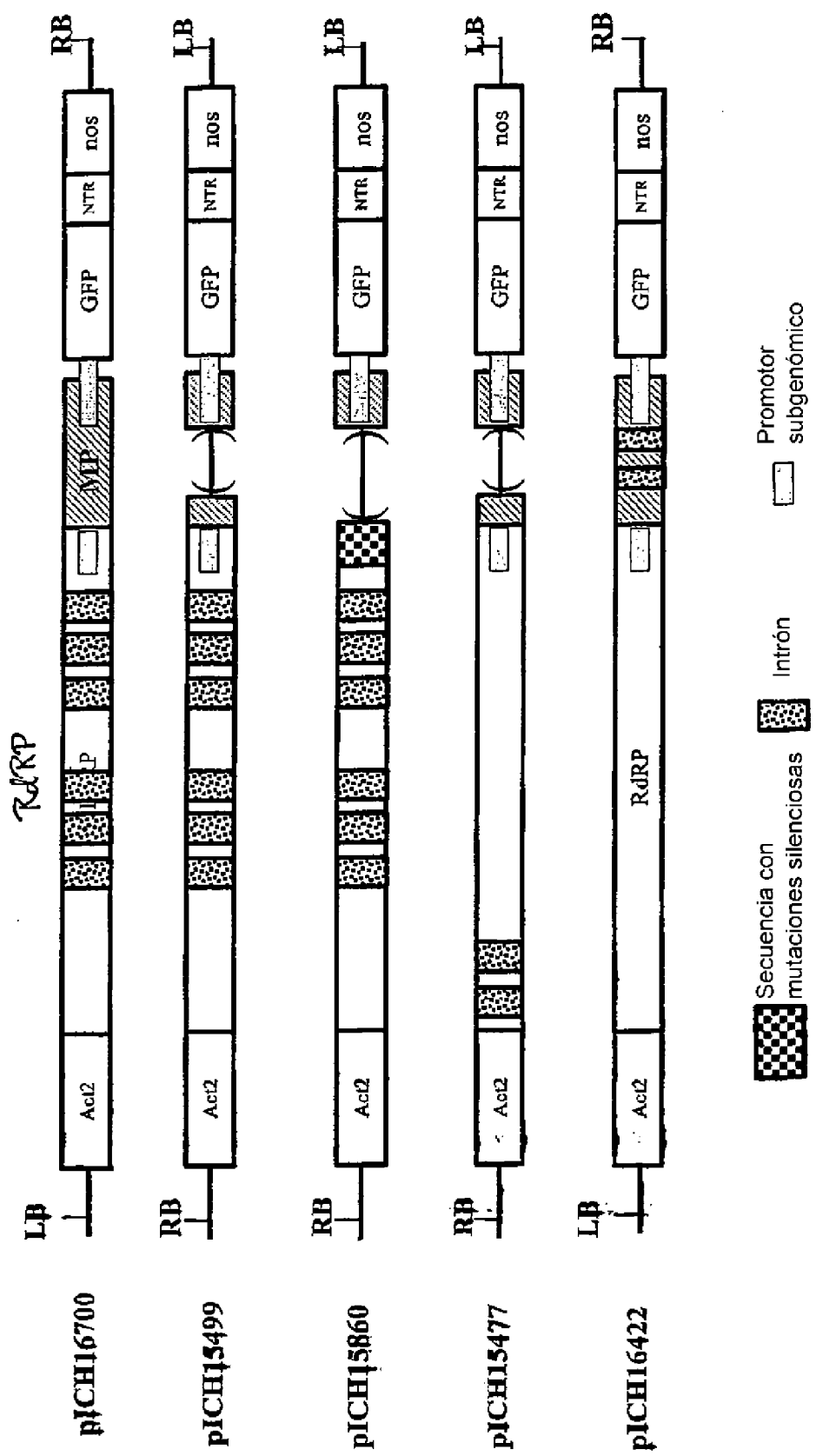


Fig. 6B

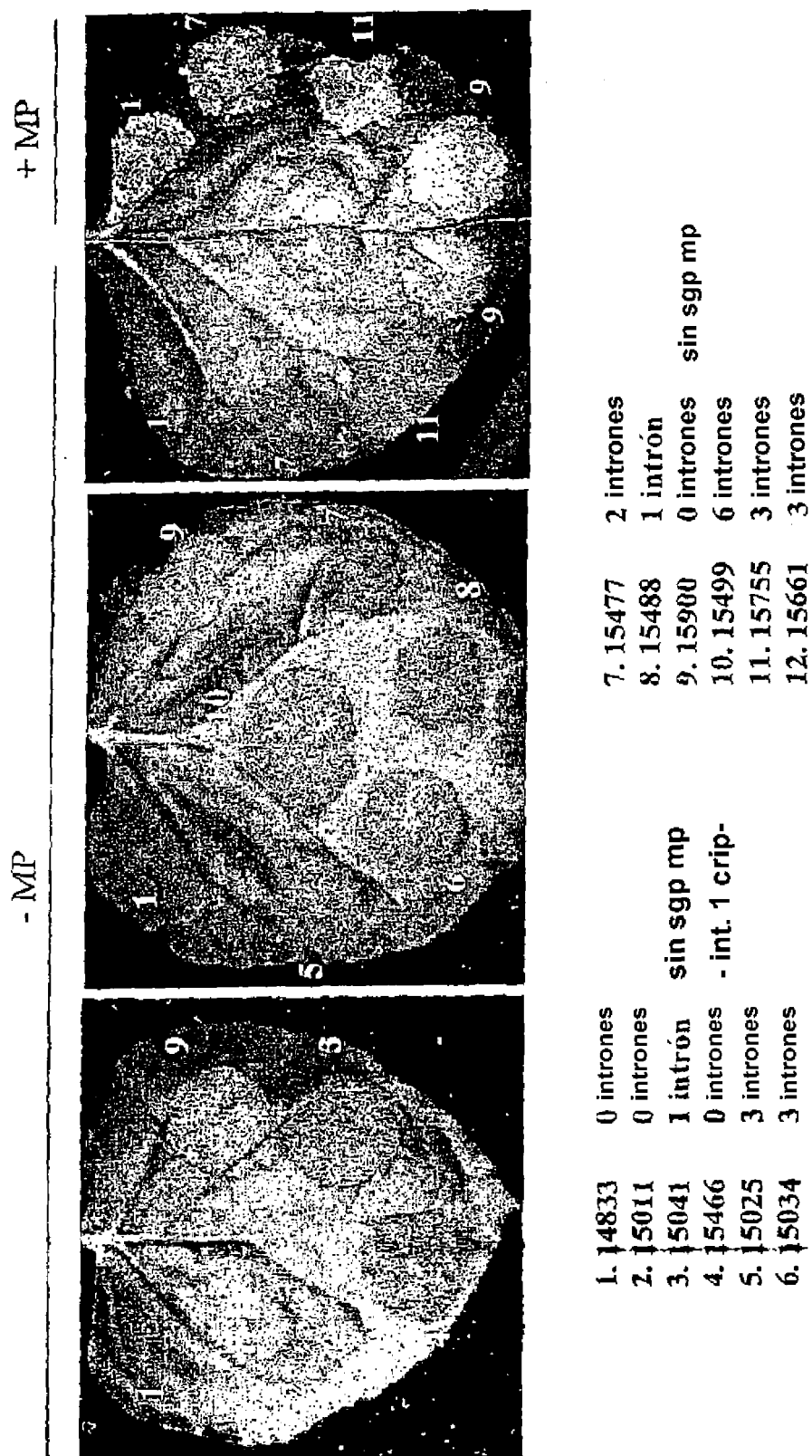
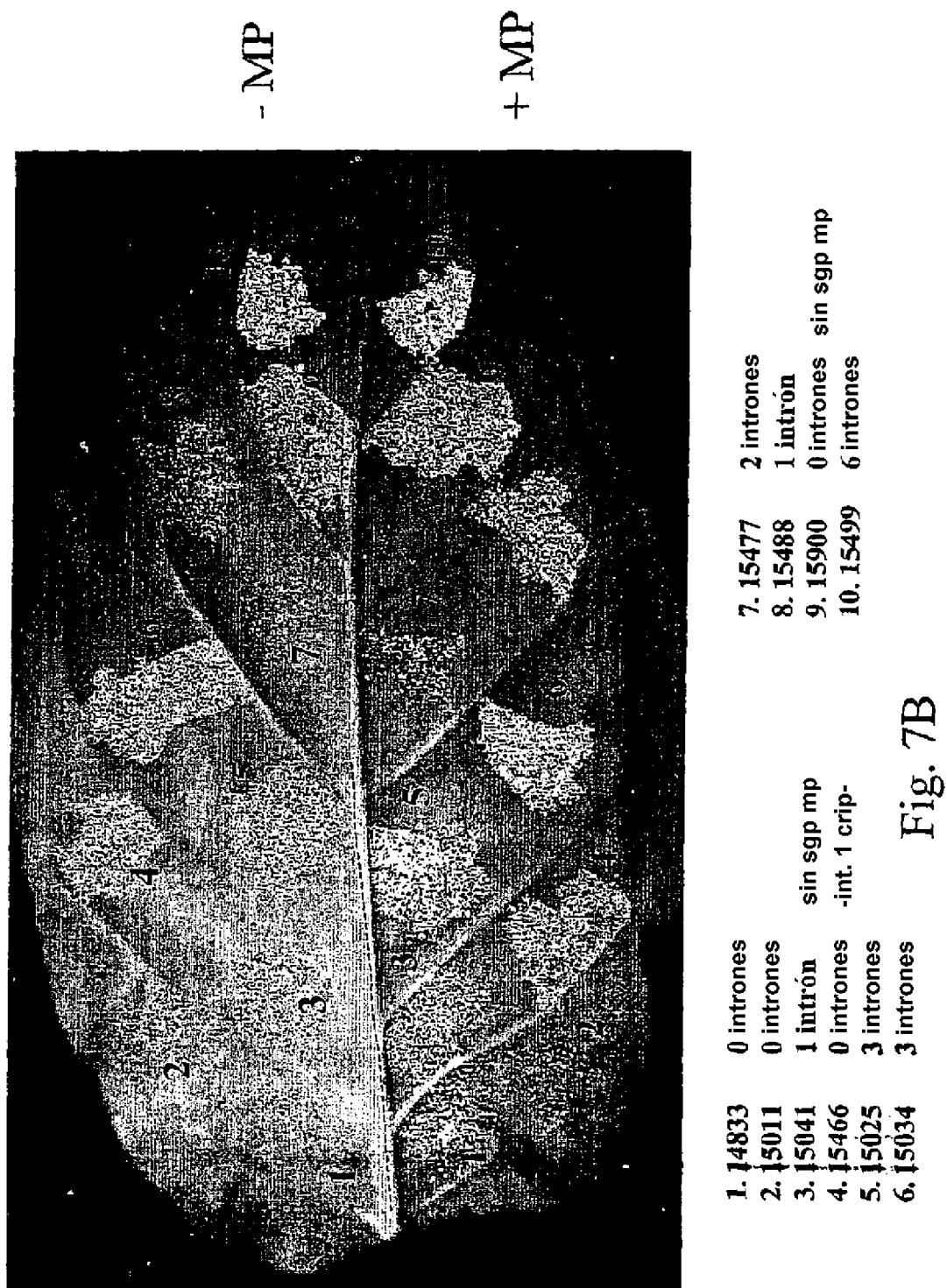


Figura 7A



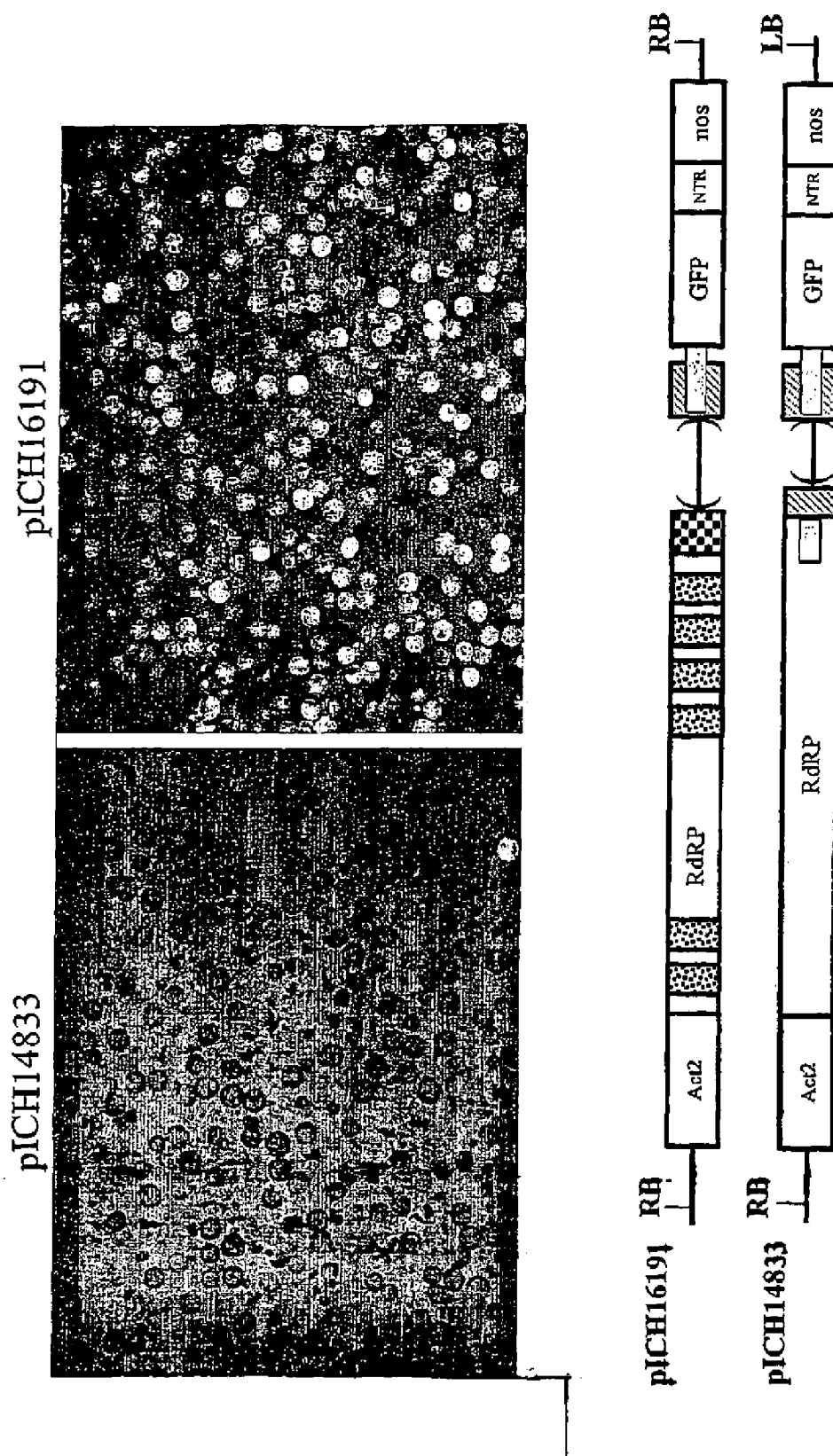


Fig. 7C

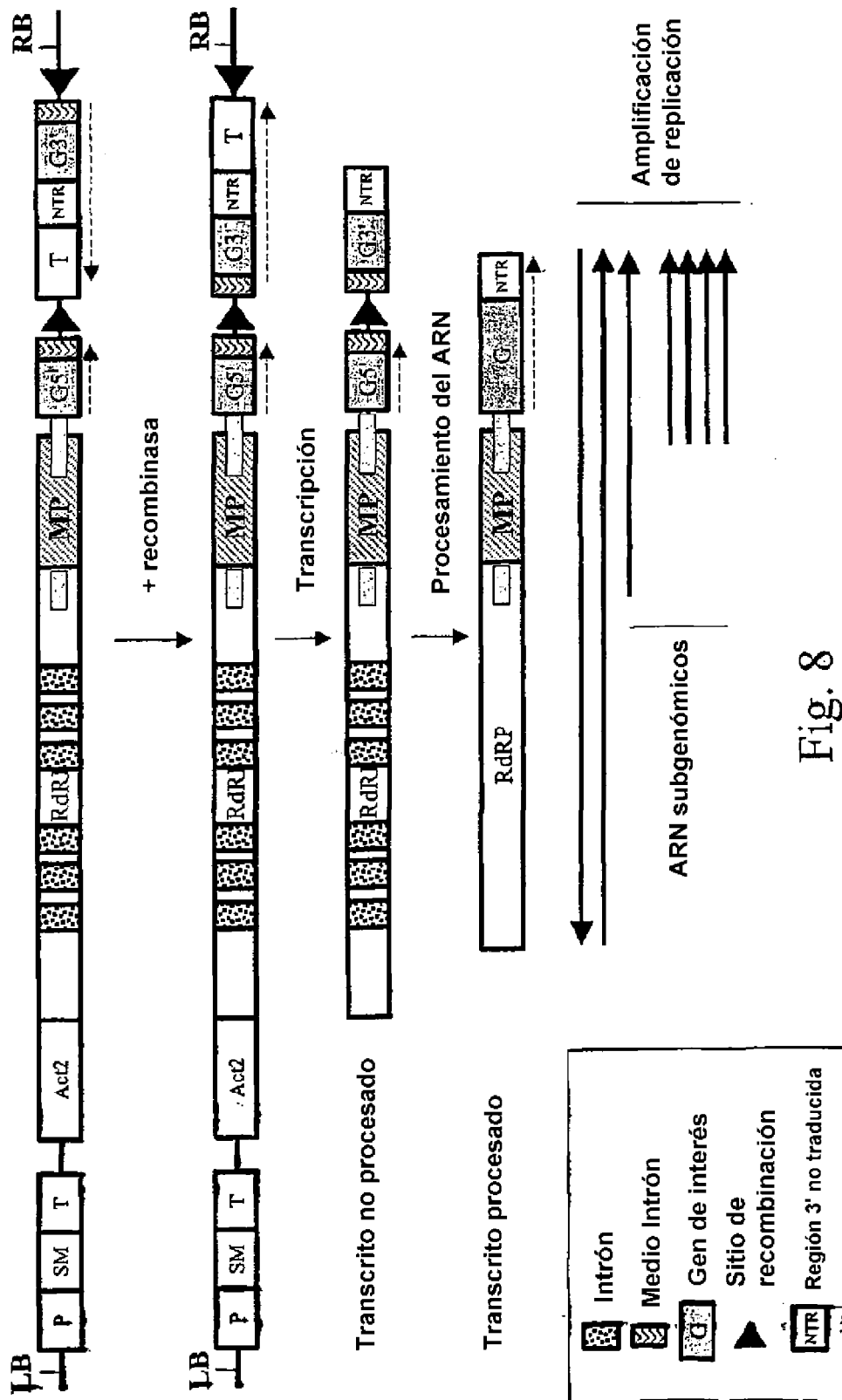


Fig. 8

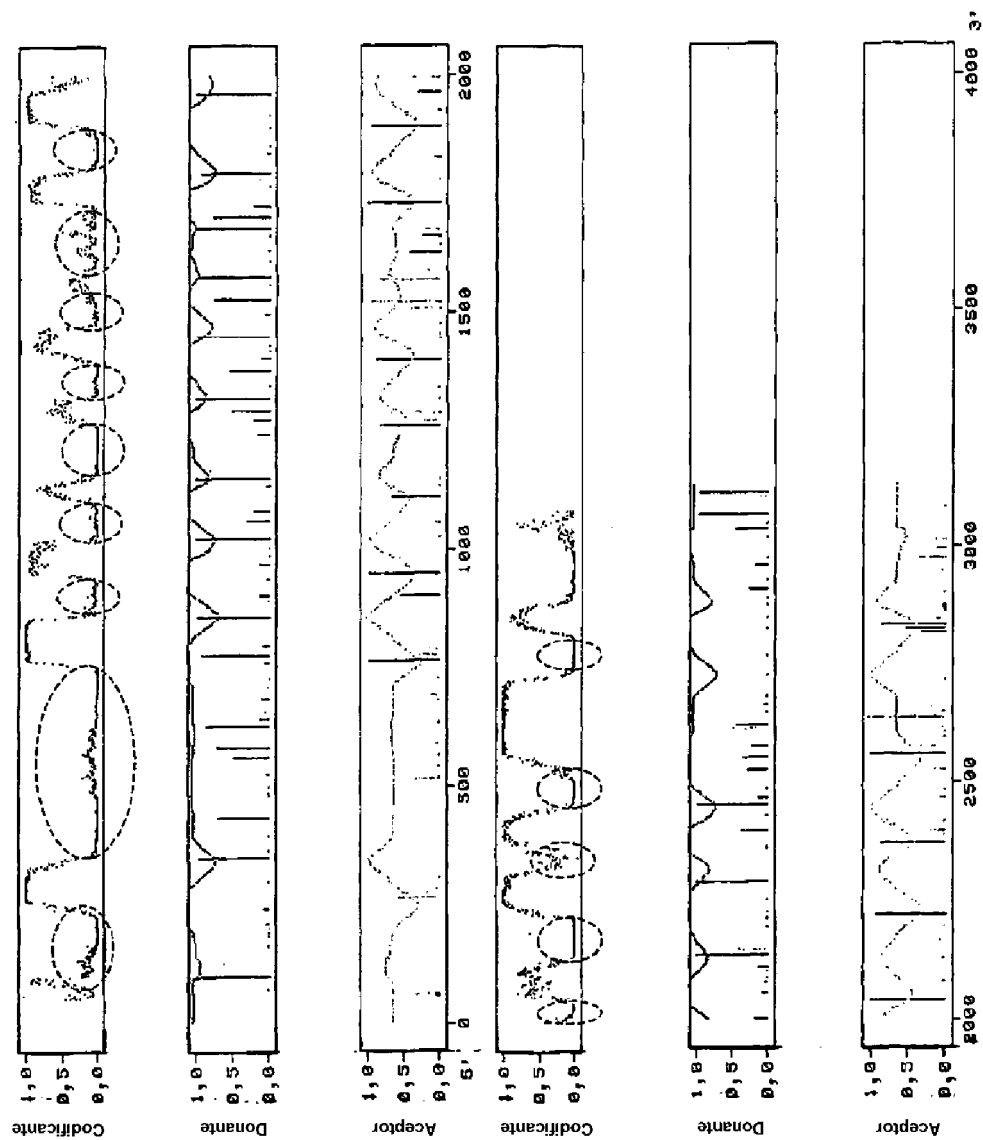


Fig. 9

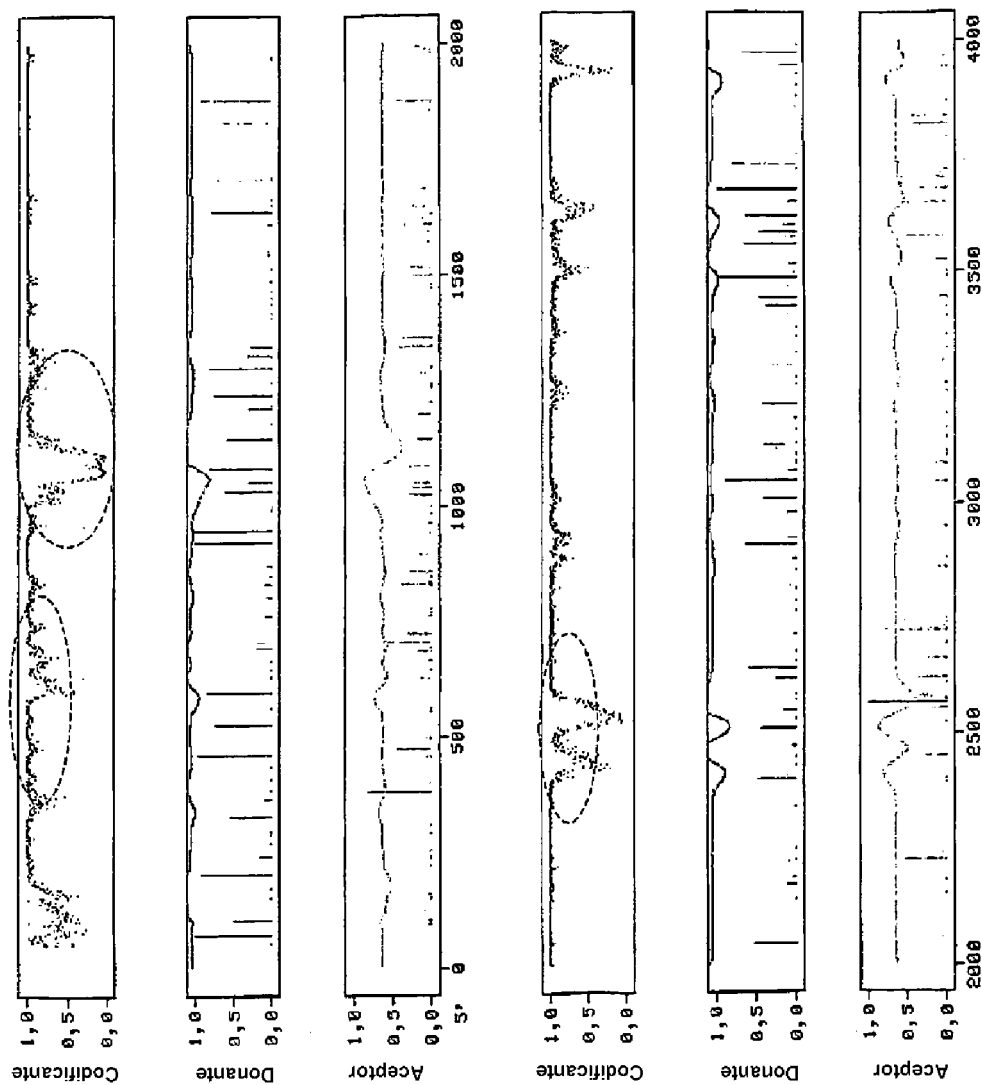


Fig. 10A

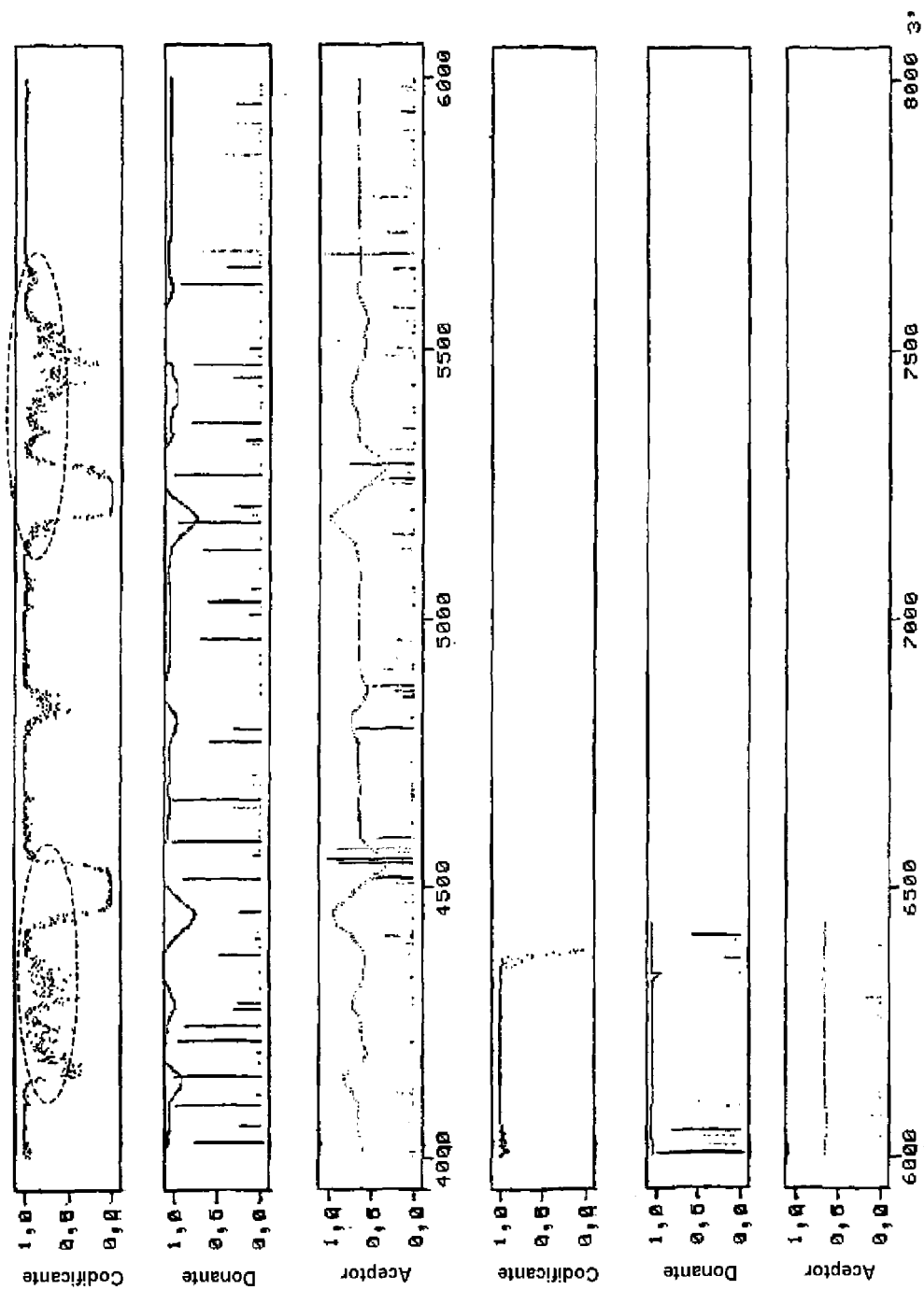


Fig. 10B

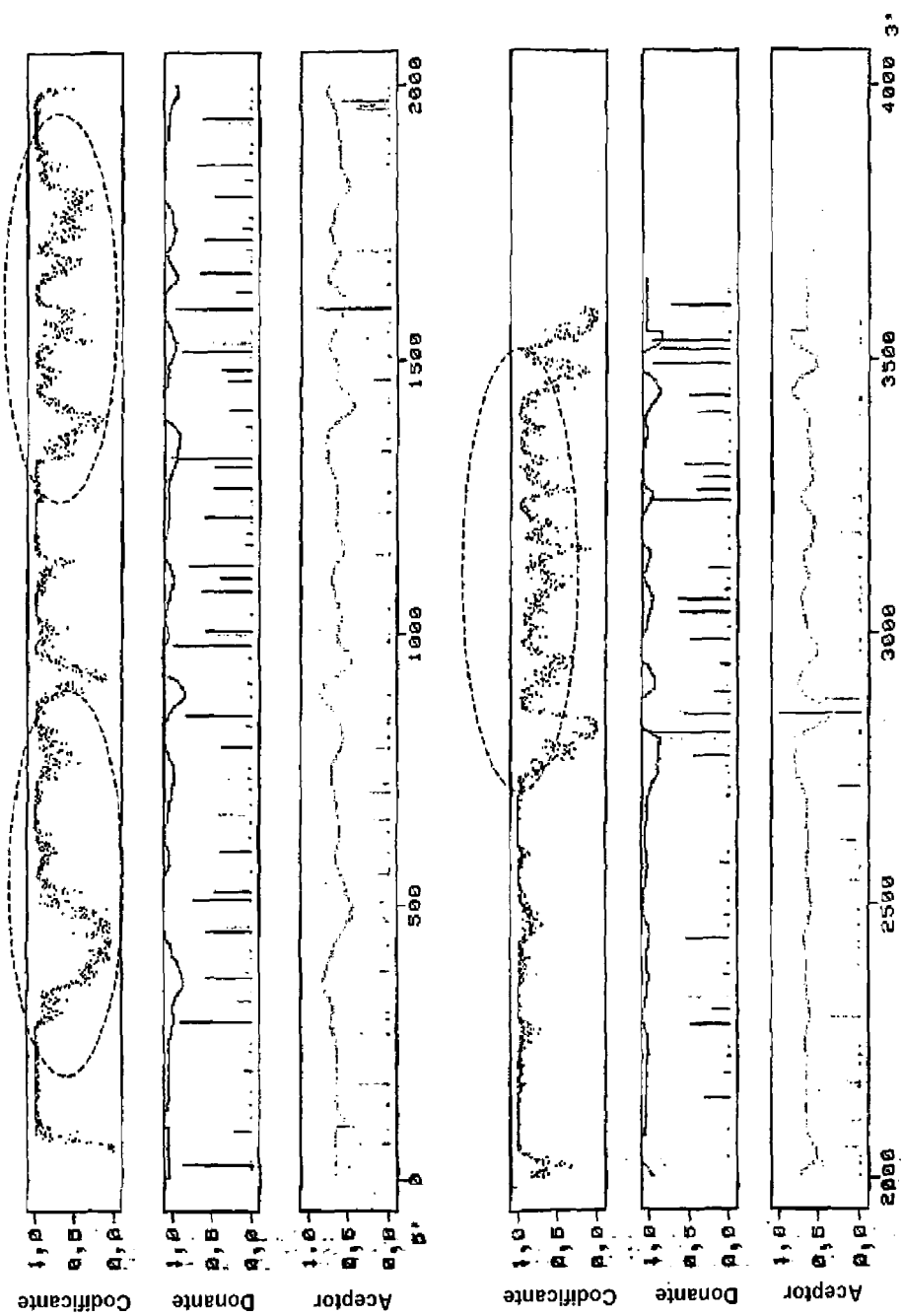


Fig. 11A

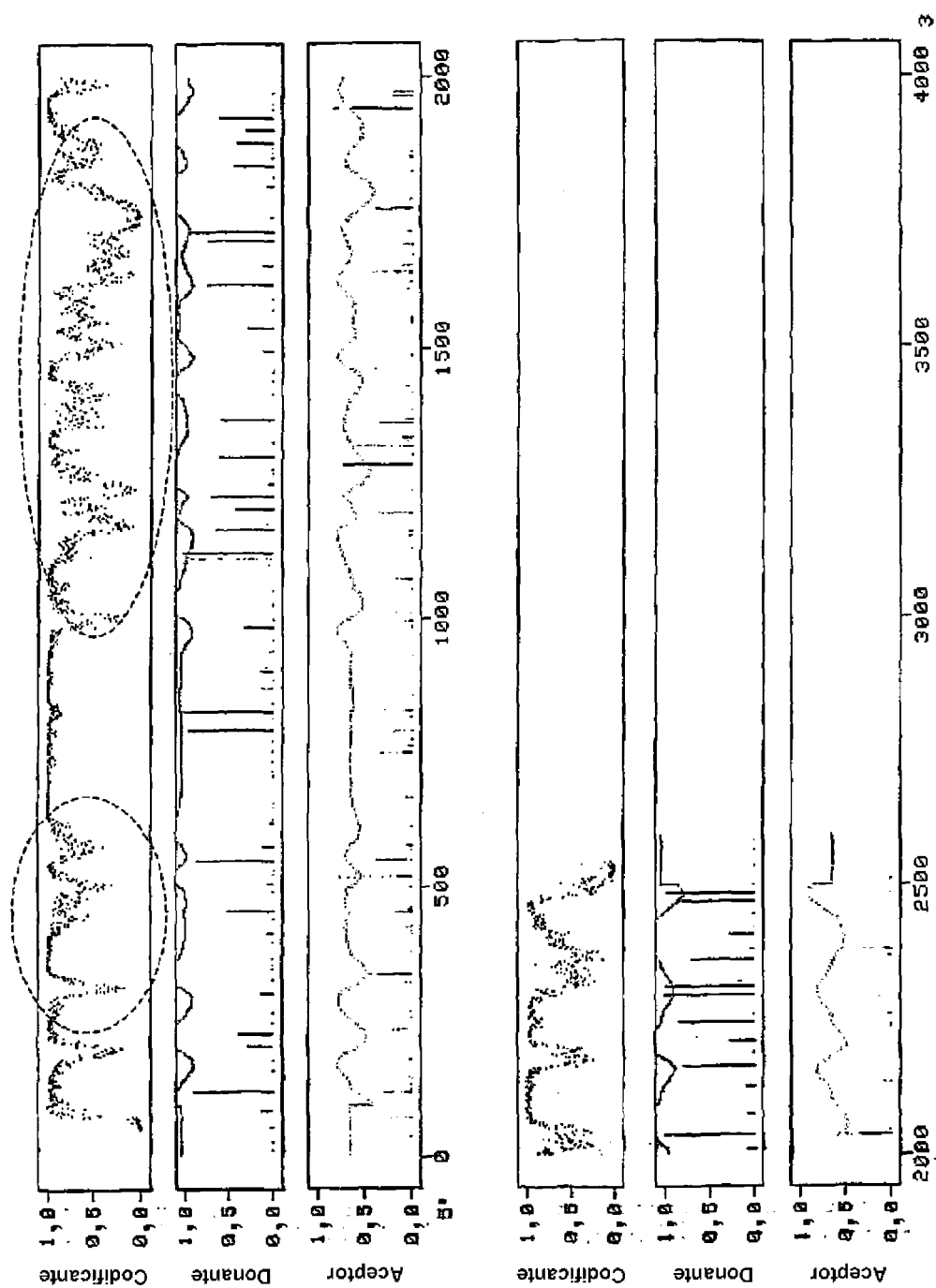


Fig. 11B

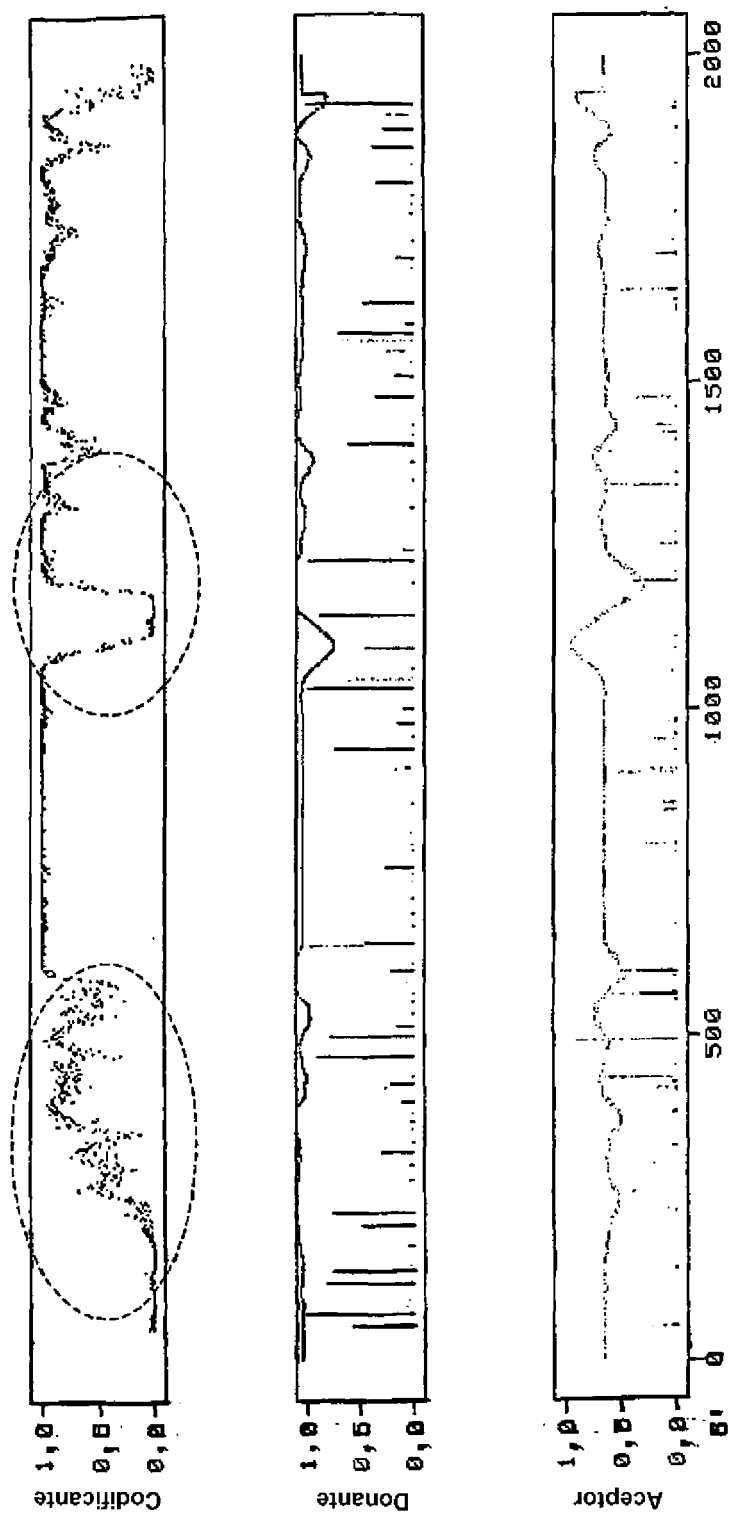


Fig. 11C

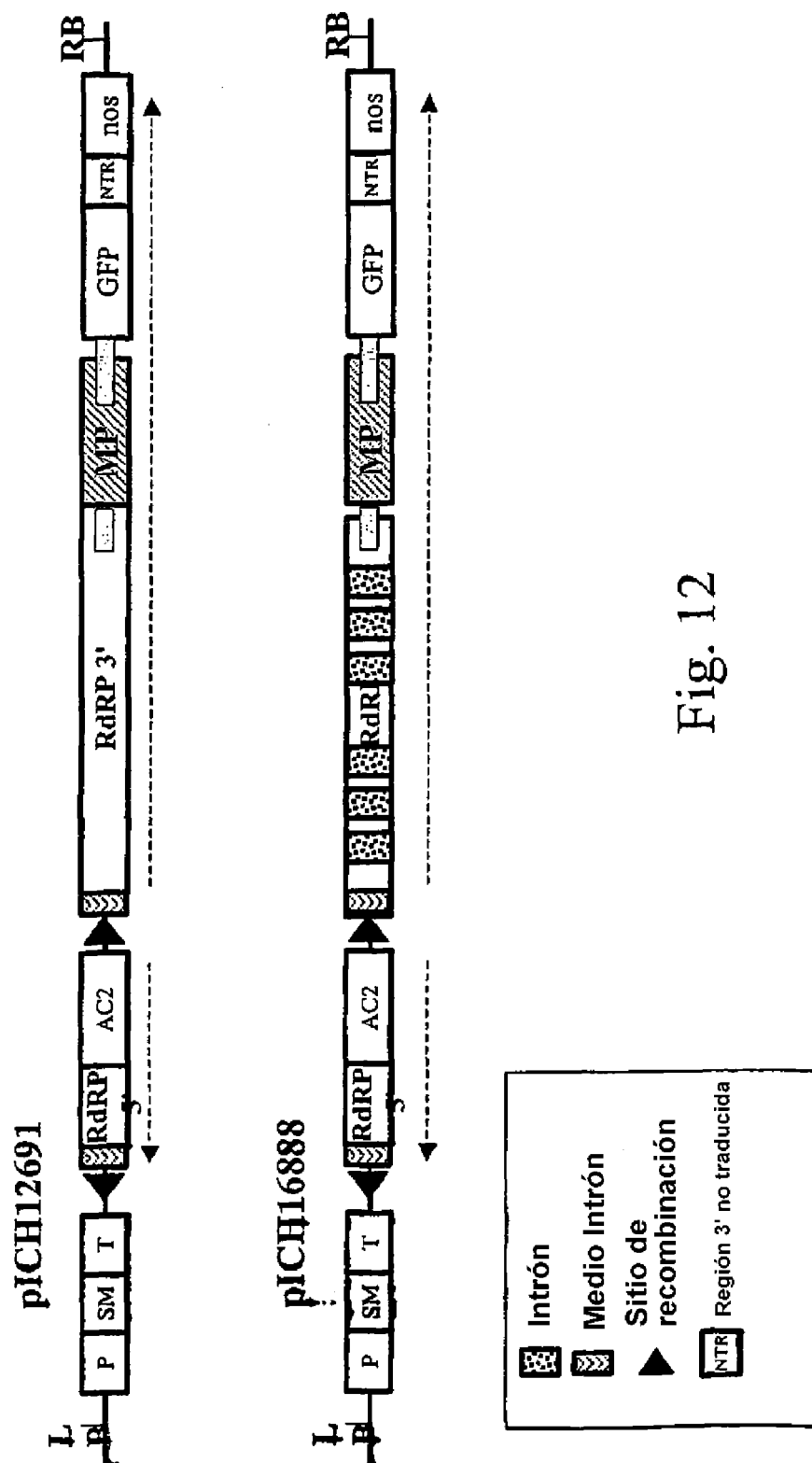


Fig. 12

Transformantes pICH16888 infiltrados con pICH14313
proporcionando integrasa

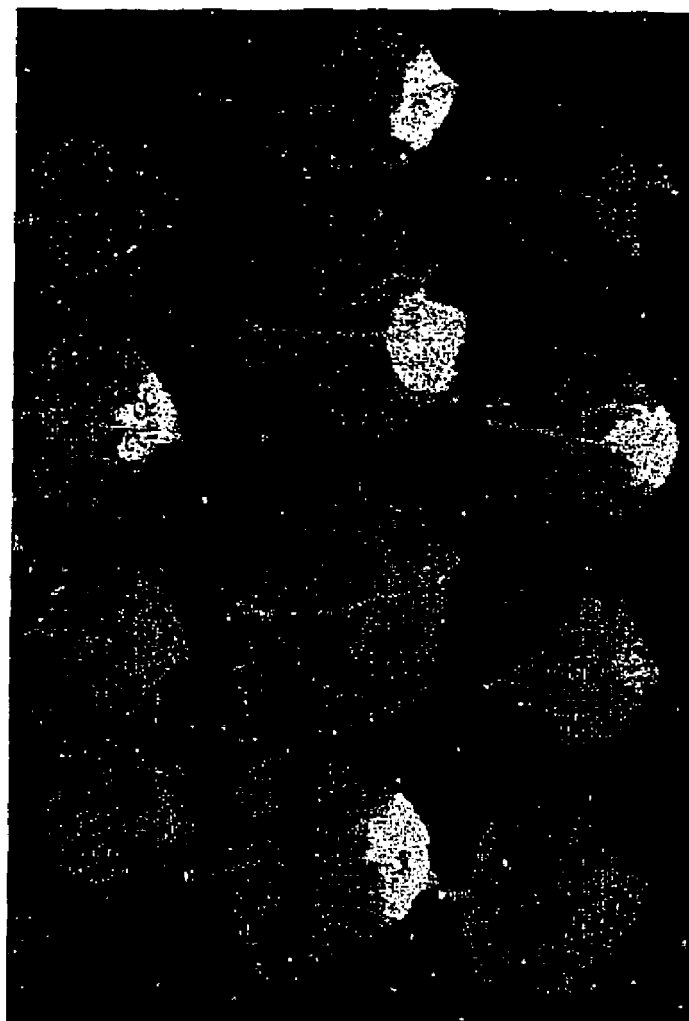
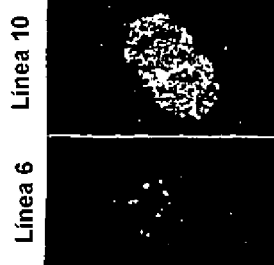


Fig. 13

Transformantes pICH12691
infiltrados con pICH10881
proporcionando integrasa



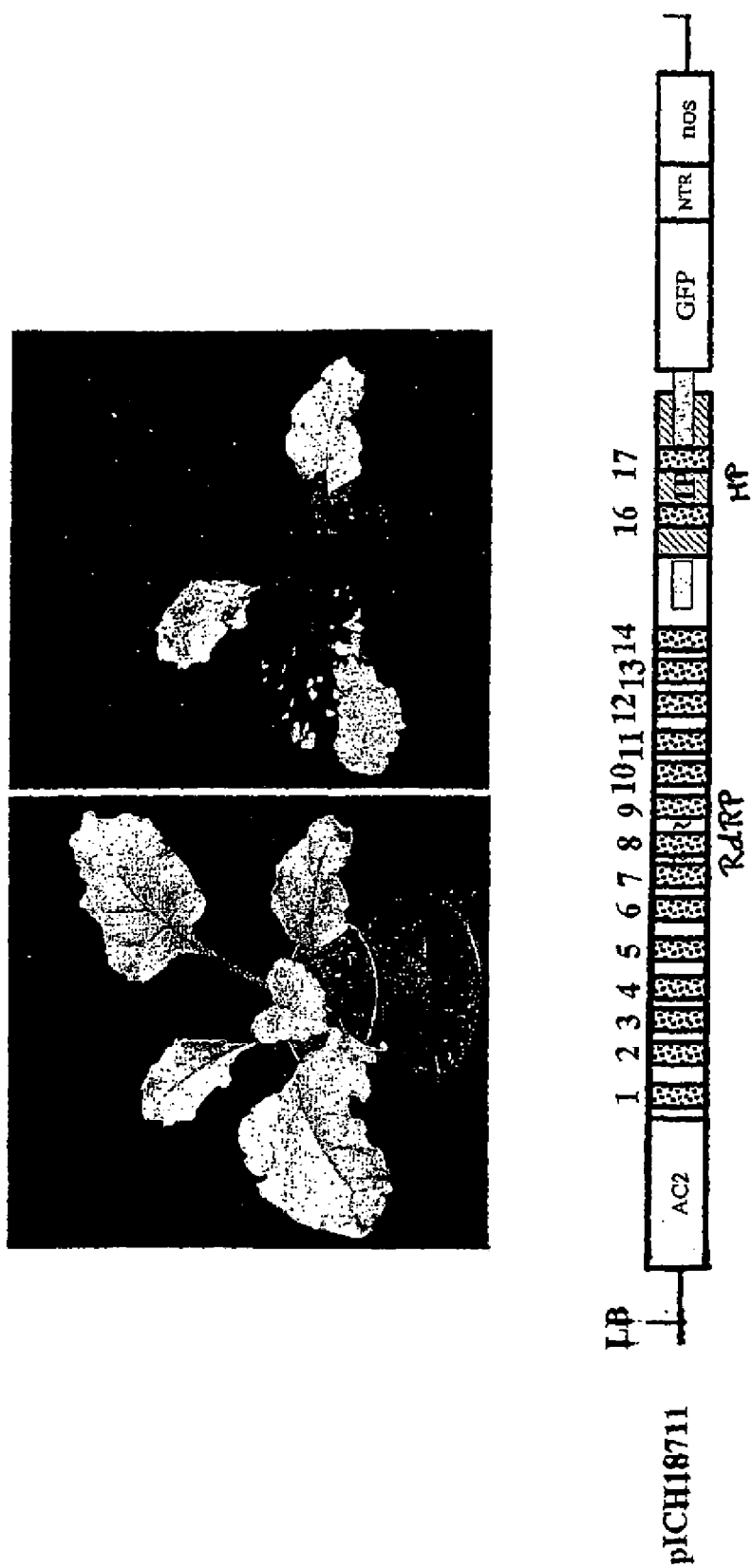


Fig. 14