



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 614**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/80** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A01H 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07001861 .9**

96 Fecha de presentación : **13.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1780284**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54

Título: **Transferencia optimizada de T-DNA y vectores asociados.**

30

Prioridad: **16.12.1999 EP 99870264**  
**10.04.2000 US 195758 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.03.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.03.2010**

73

Titular/es: **CropDesign N.V.**  
**Technologiepark 3**  
**9052 Zwijnaarde, BE**

72

Inventor/es: **Depicker, Anna;**  
**Mironov, Vladimir;**  
**Terras, Franky;**  
**Broekaert, Willem;**  
**De Buck, Sylvie y**  
**De Wilde, Chris**

74

Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 335 614 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Transferencia optimizada de T-DNA y sus vectores asociados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. Más particularmente, describe métodos para la incorporación de ADN exógeno al genoma de células eucariotas tales como células vegetales. Los aspectos concretos de la presente invención residen en el diseño de las repeticiones marginales que flanquean al ADN-T transferido mediante agrobacterias de manera que se reduce significativamente la ultralectura hacia el margen izquierdo del ADN-T y/o se puede eliminar fácilmente el ADN del esqueleto del vector integrado. De esta manera, se incrementa la frecuencia de obtención de células eucariotas transgénicas que contienen solamente el ADN-T.

15 **Antecedentes de la invención**

Se han obtenido variedades de plantas mejoradas mediante cruzamientos "clásicos" desde que el ser humano cambió la existencia nómada por un asentamiento permanente. En la historia más reciente, los científicos comenzaron a desentrañar el comportamiento del material genético durante los cruzamientos y los cultivadores de plantas pudieron beneficiarse, y aún se benefician, del conocimiento contenido en las leyes de Mendel que predicen la distribución de un rasgo genético dado en la descendencia de un cruzamiento. Con la llegada de la biología molecular de plantas, los cultivadores de plantas pueden insertar con una precisión cada vez mayor, nuevos genes quiméricos en el genoma de una planta. Actualmente se dispone de una diversidad de técnicas para intervenir en la transformación genética de plantas incluyendo la agrolística, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes y bombardeo con partículas recubiertas de ADN. Un sistema de transformación de plantas preferido y usado ampliamente hace uso de la bacteria del suelo *Agrobacterium* (Zupan y Zambryski 1995, Gelvin 1998a, Gheysen *et al.* 1998). Actualmente, *Agrobacterium* no sólo se usa para transformar plantas sino también para transformar levaduras, mohos y hongos filamentosos (Bundock *et al.* 1995, de Groot *et al.* 1998, Gouka *et al.* 1999, documento WO 98/45455). Además se ha demostrado que los componentes de la producción del ADN-T y la maquinaria de transferencia de *Agrobacterium* son útiles para importar ADN a los núcleos de células de mamífero, abriendo perspectivas para el uso de estos componentes en terapia génica (Ziemienowicz *et al.* 1999). *Agrobacterium* transfiere al núcleo de la célula eucariota todo el ADN localizado en el ADN-T. Este ADN-T es parte del plásmido Ti (en el caso de *Agrobacterium tumefaciens*) o del plásmido Ri (en el caso de *A. rhizogenes*) de tipo silvestre. El ADN-T de tipo silvestre lleva los genes que provocan, después de la integración en el genoma de la planta, tumores de agalla de corona o el síndrome de la raíz pilosa en caso de infección con *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, respectivamente. También están localizados en los plásmidos Ti o Ri de tipo silvestre los genes *vir* (genes de virulencia) que se activan mediante compuestos fenólicos de la planta. Los productos de los genes *vir* son responsables de la transferencia del ADN-T al genoma eucariota. Cuando se pretende usar para transformación, el ADN-T se desactiva (es decir, se eliminan todos los genes que provocan enfermedades) y se suministran los genes *vir* en trans sobre un plásmido auxiliar (el ADN-T que engloba el gen o los genes heterólogos está entonces localizado sobre un segundo vector de transformación binario de la planta) o en cis en el caso de un vector de transformación de la planta co-integrado. Los genes heterólogos de interés se clonan entre las dos secuencias centrales de margen imperfectas del ADN-T de 22 pb (en el caso de plásmidos Ti de octopina) o de 25 pb (en el caso de plásmidos Ti de nopalina) que constituyen el margen derecho (RB) y el margen izquierdo (LB), que son los únicos elementos en cis necesarios para dirigir el procesamiento del ADN-T. Las secuencias centrales marginales del RB y del LB están organizadas como repeticiones imperfectas.

Las proteínas VirD1 y VirD2 producen un corte de cadena sencilla entre la tercera y cuarta base en la cadena inferior de cada repetición marginal (Yanofsky *et al.* 1986). El aumento de los niveles de VirD1 y VirD2 potencia la producción de complejos de ADN-T dentro de *Agrobacterium* y da como resultado una mayor eficacia en la transformación de la planta (Wang *et al.* 1990).

Durante muchos años se ha creído que solamente se transfería a la célula eucariota el ADN entre las repeticiones, el ADN-T, y no el ADN del vector externo al ADN-T. No obstante, una caracterización reciente y más detallada de los insertos de ADN en plantas transgénicas demuestra que también se integran en el genoma de la planta con mucha frecuencia secuencias del esqueleto del vector (Martineau *et al.* 1994, Ramanathan y Veluthambi 1995, Cluster *et al.* 1996, van der Graaff *et al.* 1996, Kononov *et al.* 1997, Wenck *et al.* 1997, Wolters *et al.* 1998).

Los autores de la presente invención han descubierto previamente que la frecuencia de integración de las secuencias del vector no está influenciada por las especies de plantas o el método de transformación usado. Esto es coherente con la visión de que la transferencia de secuencias del esqueleto del vector es la consecuencia de la ultralectura más allá del LB, un proceso que se produce dentro de las células de *Agrobacterium* y que seguramente esté determinado por factores dentro de estas células. No obstante, se debe advertir que otros han informado sobre la integración del esqueleto del vector en el 33% de los transformantes de *Arabidopsis* obtenidos mediante transformación radicular y en hasta el 62% de los transformantes obtenidos mediante infiltración por vacío (Wenck *et al.* 1997). Esto implica que el método de transformación usado podría ser otro factor que influye en la frecuencia de la integración del esqueleto del vector. Se ha notificado que la integración de secuencias del esqueleto del vector se produce en muchas especies de plantas incluyendo *Petunia* (Virts y Gelvin 1985, Cluster *et al.* 1996), *Arabidopsis* (van der Graaff *et al.* 1996, Wenck *et al.* 1997), tabaco (Ramanathan y Veluthambi 1995, Kononov *et al.* 1997, Wenck *et al.* 1997) y patata (Wolters *et*

al. 1998). La integración del esqueleto del vector aparentemente es independiente del tipo de cepa de *Agrobacterium* usada para la transformación de la planta (Kononov *et al.* 1997).

Los inventores han analizado previamente diferentes series de transformantes con respecto a la presencia de secuencias del esqueleto del vector mediante el uso de reacciones de PCR específicas y análisis de transferencia de ADN en gel. Se evaluaron tres métodos de transformación diferentes en dos especies de plantas diferentes, particularmente transformación radicular y folicular de *Arabidopsis thaliana* y transformación protoplástica y folicular de *Nicotiana tabacum*. Por último, se evaluó la influencia del tipo de replicón, los replicones ColE1 y pVS1. Los resultados demostraron que ni las especies de plantas ni el tipo de explante usado para la transformación, el tipo de replicón o la selección tienen una influencia fundamental sobre la frecuencia con la cual se producía la integración de las secuencias del vector. En el pasado se postuló que esta transferencia del ADN del vector que no pertenece al ADN-T podría ser el resultado de la ultralectura en el margen izquierdo, que impediría la terminación normal de la transferencia del ADN-T. Como alternativa, la transferencia de ADN podría comenzar en el margen izquierdo y proseguir hacia el margen derecho (Ramanathan y Veluthambi, 1995; van der Graaff *et al.*, 1996). No obstante, en las plantas transgénicas descritas anteriormente se observó que muchas contenían secuencias del esqueleto del vector unidas al margen izquierdo así como uniones del vector con el margen derecho del ADN-T. Las transferencias de ADN en gel indican que en la mayoría de estas plantas se integra la secuencia completa del vector. Por tanto, se postuló que la integración en el genoma de la planta de secuencias completas del esqueleto del vector puede ser el resultado de una transferencia conjugativa iniciada en el margen derecho y seguida posteriormente con la copia en los márgenes izquierdo y derecho, denominada ultralectura. Este modelo implica que el margen izquierdo no se reconoce con frecuencia como un sitio de iniciación para la transferencia de ADN y que el margen derecho no se reconoce eficazmente como un sitio de terminación para la transferencia de ADN. Estas observaciones concuerdan con los resultados de trabajos previos que demuestran que la región del margen derecho es intrínsecamente más activa que la región del margen izquierdo en la promoción de la transformación del ADN-T (Jen y Chilton 1986a,b, Caplan *et al.* 1985). A partir de todos los datos disponibles, se puede concluir que la formación de la cadena T comienza mucho más frecuentemente en el margen derecho que en la región del margen izquierdo.

En el futuro, será de suma importancia prevenir o curar la integración del esqueleto del vector como consecuencia de la transformación mediada por *Agrobacterium*. En primer lugar, las autoridades reguladoras están demandando que las plantas transgénicas puestas en circulación en el mercado ordinario carezcan de secuencias del esqueleto del vector. Estas secuencias del esqueleto pueden llevar orígenes de replicación bacterianos, genes bacterianos de resistencia a antibióticos y posiblemente varios genes distintos (exógenos). También expresarán la misma preocupación rigurosa los consumidores que cada vez son más conscientes de estos riesgos potenciales asociados con la biotecnología de plantas. En segundo lugar, también desde un punto de vista científico es deseable no tener la integración del esqueleto del vector en el genoma de plantas. Estas secuencias pueden influir en la expresión transgénica (Iglesias *et al.* 1997, Matzke y Matzke 1998, Jakowitsch *et al.* 1999). También es probable que la integración del esqueleto del vector interfiera con experimentos de marcaje del ADN-T. Los marcadores pueden ser considerablemente más largos de lo esperado (Martineau *et al.* 1994) y la integración del esqueleto del vector también podría ser la explicación del hecho de que en un gran porcentaje plantas del género *Arabidopsis* con el ADN-T marcado, el ADN-T no se co-segrega con un fenotipo mutante (Errampali *et al.* 1991, Feldmann 1991, Koncz *et al.* 1992, van Lijsebettens *et al.* 1991).

Aunque ya se observó el fenómeno de la integración ocasional del esqueleto del vector en 1982 por Ooms *et al.*, no fue hasta 1995 cuando se sugirió una primera solución por Ramanathan y Veluthambi (1995): "... se pueden construir nuevos vectores binarios con señales de "terminación de la transferencia" adyacentes al margen izquierdo". Desde entonces, se ha intentado entender el mecanismo de integración del esqueleto del vector. Wenck *et al.* (1997) describieron una posible razón: "... el corte ineficaz puede deberse a pequeñas cantidades de proteínas de virulencia, principalmente VirD2". No obstante, sólo muy recientemente se han descrito métodos que previenen la ultralectura en los márgenes del ADN-T (documento WO 99/01563) y por Hanson *et al.* (1999). Estos métodos se basan en la inclusión de secuencias fuera de los márgenes. Estas secuencias son genes que codifican compuestos tóxicos o secuencias capaces de interactuar con proteínas que se unen al ADN o secuencias que están enriquecidas en nucleótidos G+C. Un inconveniente importante de los métodos descritos en el documento WO 99/01563 y por Hanson *et al.* (1999) es que se previene la regeneración de los transformantes de plantas que llevan más que la región de ADN-T en su genoma. Es imaginable que tales métodos mermen la eficacia de la transformación global, es decir, se obtendrá un menor número de transformantes a partir de un experimento de transformación dado. De hecho, Hanson *et al.* (1999) notificaron que la eficacia de transformación del tabaco cayó hasta un 30%. No obstante, Hanson *et al.* (1999) describieron su estrategia como una herramienta útil "para la eliminación de secuencias que no son ADN-T de individuos transgénicos".

La presente invención describe una solución al problema técnico de la integración no deseada del esqueleto del vector y proporciona ventajas sobre los métodos existentes.

### Resumen de la invención

La invención describe vectores de transformación que comprenden un ADN-T con márgenes de ADN-T flanqueantes. Los vectores de ADN-T se caracterizan por que están modificados de manera que permiten la transformación genética de una célula eucariota sólo con el ADN-T y no con secuencias del esqueleto del vector. Esto se consigue impidiendo la transferencia de las secuencias del esqueleto del vector al genoma de una célula eucariota o curando de secuencias del esqueleto del vector transferidas al genoma de una célula eucariota. Dichos vectores de ADN-T modi-

## ES 2 335 614 T3

ficados permiten un procesamiento eficaz del margen izquierdo mediante el complejo de corte que implica al menos a VirD1 y a VirD2 o permiten la escisión de secuencias del esqueleto del vector transferidas.

5 La presente solicitud describe vectores de ADN-T optimizados que incluyen una modificación del margen derecho del ADN-T que comprende una única secuencia central del margen derecho flanqueada por una región externa del margen derecho y/o una modificación, incluyendo una multiplicación, del margen izquierdo del ADN-T, diseñados como:

- 10 a) una única secuencia central del margen izquierdo flanqueada por una región externa natural del margen izquierdo y una región proximal del margen izquierdo intra-ADN-T con una longitud de 10 a 100 pb, preferiblemente 20-100 pb, y que está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT preferiblemente del 60 al 85%, siendo más preferiblemente del 64 al 80%, siendo de la forma más preferida del 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78 ó 79%, siempre que dicha región proximal en el margen izquierdo intra-ADN-T no sea la región interna del margen izquierdo de tipo octopina natural correspondiente, o
- 15 b) una única secuencia central del margen izquierdo flanqueada solamente por una región interna natural del margen izquierdo, o
- 20 c) una única secuencia central del margen izquierdo; o
- d) una repetición en tándem de varias secuencias centrales del margen izquierdo flanqueada solamente por una región externa natural del margen izquierdo, conteniendo preferiblemente la repetición en tándem 2-3 secuencias centrales del margen izquierdo pero sin excluir un número de copias superior de la repetición imperfecta central del margen izquierdo y estando separadas dichas secuencias centrales del margen izquierdo repetidas en dicho tándem por una secuencia de al menos 10-20 pb que opcionalmente lleva codones de terminación en los tres marcos de lectura y en ambas direcciones; o
- 25 e) una región de margen izquierdo de tipo nopalina integral adyacente a y cadena abajo o cadena arriba de la región de margen izquierdo de tipo octopina integral.

30 La solicitud describe adicionalmente vectores de transformación de ADN-T optimizados con secuencias de ADN adicionales fuera de las repeticiones centrales del margen de ADN-T que permiten la eliminación después de la transformación de secuencias del esqueleto del vector integradas. Dichas secuencias de ADN adicionales modifican, incluyendo por multiplicación, las regiones del margen de ADN-T o sus partes y comprenden:

- 35 f) sitios de recombinación organizados como repeticiones cadena abajo de la secuencia central del margen izquierdo y cadena arriba de la secuencia central del margen derecho; o
- 40 g) dichas secuencias de ADN de (f) modificadas adicionalmente mediante la adición de una segunda copia de una región en el margen izquierdo situada cadena arriba de y preferiblemente adyacente a la única región externa del margen derecho y dicho sitio de recombinación cadena arriba de la secuencia central de dicha segunda región de margen izquierdo; o
- 45 h) dichos sitios de recombinación de (f) con un gen de recombinasa, cadena abajo de dicho sitio de recombinación cadena abajo de la secuencia central del margen izquierdo, y preferiblemente, cuando está presente, adyacente a y cadena abajo de la región externa del margen izquierdo; o
- 50 i) una secuencia de ADN localizada cadena abajo de la región del margen izquierdo, comprendiendo dicha secuencia de ADN un gen de recombinasa flanqueado por repeticiones de sitios de recombinación como se ha definido en (h) y comprendiendo adicionalmente una segunda copia de una región de margen izquierdo cadena abajo de dicha recombinasa; o
- 55 j) la secuencia de ADN de (i) con sitios de recombinación adicionales organizados como repeticiones cadena abajo de la segunda secuencia central del margen izquierdo y cadena arriba de la única secuencia central del margen derecho.

60 En cualquiera de dichas modificaciones (f), (g), (h), (i) o (j), dichos sitios de recombinación están localizados adyacentes a y cadena abajo y/o cadena arriba de las secuencias centrales del margen izquierdo y/o derecho o están separados de las secuencias centrales del margen izquierdo y/o derecho por una secuencia de al menos 10-20 pb de longitud que opcionalmente lleva codones de terminación en los tres marcos de lectura y en ambas direcciones.

65 En cualquiera de dichas modificaciones (f), (g), (h), (i) o (j), dichos sitios de recombinación son sitios de recombinación específicos de sitio dispuestos como repeticiones directas o secuencias marginales de transposones dispuestas como repeticiones invertidas y dicho gen de recombinasa es un gen de recombinasa específico de sitio o un gen de transposasa, respectivamente.

## ES 2 335 614 T3

Una primera realización de la invención se refiere a un vector de transformación de ADN-T que comprende ADN-T con márgenes de ADN-T modificados flanqueantes izquierdo y derecho, *caracterizado por que* el margen derecho de ADN-T modificado consiste en una región externa de margen derecho, una secuencia central del margen derecho y una región interna de margen derecho, y el margen izquierdo de ADN-T modificado consiste en:

- (i) una repetición de los márgenes izquierdos del ADN-T donde dicha repetición comprende al menos un margen izquierdo de ADN-T de tipo nopalina y al menos un margen izquierdo de ADN-T de tipo octopina, *caracterizada adicionalmente por que* dicho margen izquierdo de ADN-T modificado comprende al menos una secuencia central del margen izquierdo, o
- (ii) una única secuencia central del margen izquierdo, una región externa del margen izquierdo y una región proximal del margen izquierdo de la región interna con una longitud preferible de 10 a 100 pb, *caracterizada adicionalmente por que* dicha región proximal del margen izquierdo de la región interna está enriquecida en el número de residuos de A y T, estando el porcentaje de residuos AT entre el 60 y el 85%.

Otra realización de la invención incluye vectores de transformación en los que se aplica cualquiera de dichas modificaciones como se ha definido en (i) o (ii), o se aplican en combinación.

Estos vectores de transformación comprenden vectores usados en la transformación mediada por *Agrobacterium*, incluyendo vectores de transformación binarios, vectores de transformación de tipo co-integrado, vectores de transformación de tipo superbinario, vectores de transformación derivados de Ri así como vectores que llevan ADN-T usados en transformación agrolística o terapia génica.

La presente solicitud describe un método para obtener células eucariotas transgénicas transformadas solamente con ADN-T impidiendo la transferencia de secuencias del esqueleto del vector usando dichos vectores de transformación optimizados que contienen cualquiera de dichas modificaciones (a) a (j).

En la presente solicitud además se describe un método para la obtención de células eucariotas transgénicas transformadas solamente con el ADN-T que permite la curación de dichas células transformadas que contienen secuencias del esqueleto del vector usando dichos vectores de transformación optimizados que contienen dicha secuencia de ADN de (f) o (g) en combinación con el suministro de una recombinasa específica de sitio o transposasa, o de dichas secuencias de ADN (h), (i), o (j) eventualmente en combinación con el suministro de una recombinasa específica de sitio o una transposasa. Por curación se entiende la eliminación de las secuencias del esqueleto del vector de transformación que posiblemente se originan en dicho vector sin suprimir el acontecimiento de transformación del ADN-T.

También es parte de la invención un método para obtener plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos transgénicos que consiste en la transformación mediada por *Agrobacterium* de dichas plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos con un vector de acuerdo con la primera realización. Otro método de la invención es un método para prevenir la integración de secuencias del esqueleto del vector en una célula transformada mediada por *Agrobacterium* que comprende el uso de un vector de acuerdo con la primera realización.

Dicho método puede comprender adicionalmente el incremento de la producción por *Agrobacterium* del complejo de corte que al menos implica a VirD1 y VirD2. Dichos componentes del complejo de corte están codificados por el operón *virD* (de tipo octopina o de tipo nopalina).

Al menos una copia extra se integra en entidades de ADN cromosómico y/o extracromosómico contenidas y mantenidas dentro de una cepa de *Agrobacterium*. Dicha copia extra del locus *VirD* así se puede seleccionar entre el locus *VirD* de tipo octopina o el locus *VirD* de tipo nopalina. Para reducir la ultralectura en el margen izquierdo de ADN-T, dicho método se puede aplicar solo o junto con vectores de transformación que contienen márgenes de ADN-T modificados.

En esta solicitud también se describe cualquier combinación de métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T de la invención para prevenir o curar la integración de secuencias del esqueleto del vector con cualquier otro método y/o modificación del vector de ADN-T aplicada para prevenir o curar la integración de secuencias del esqueleto del vector.

Las células hospedadoras recombinantes que contienen dichos vectores de transformación modificados de acuerdo con la presente invención, como bacterias, preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens* también constituyen la invención.

También se describe en esta solicitud cualquier combinación del sistema de recombinación específico de sitio o el sistema de recombinación mediado por transposasa de la presente invención para curar la integración de secuencias del esqueleto del vector con el mismo o cualquier otro sistema de recombinación específico de sitio o sistema de recombinación mediado por transposasa usado para cualquier otro propósito.

También están comprendidos dentro de la invención métodos de transformación basados en agrolística de una célula eucariota que usa un vector de ADN-T modificado de acuerdo con las alteraciones definidas en los vectores mencionados anteriormente en (i) o (ii).

También se describen en esta solicitud métodos de terapia génica que usan un vector de ADN-T modificado de acuerdo con las alteraciones definidas en los vectores como se ha mencionado anteriormente.

Las células vegetales o las plantas transgénicas que pueden obtenerse mediante un método de transformación mediado por *Agrobacterium* como se ha definido anteriormente, parte de dicha planta o su progenie también constituyen la presente invención.

Las levaduras, mohos u hongos filamentosos transgénicos que pueden obtenerse mediante un método de transformación mediado por *Agrobacterium* como se ha definido anteriormente también constituyen la presente invención.

Con los anteriores y otros objetos, ventajas y características de la invención que serán evidentes más adelante, la naturaleza de la invención se puede entender más claramente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y a las reivindicaciones adjuntas.

### 15 Descripción detallada de la invención

La transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación agrolística de plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos se basa en la transferencia de parte de las secuencias del vector de transformación, denominado ADN-T, al núcleo y en la integración de dicho ADN-T en el genoma de dicho eucariota.

Por “*Agrobacterium*” se entiende un miembro de la familia *Agrobacteriaceae*, más preferiblemente *Agrobacterium* o *Rhizobacterium* y de la forma más preferida *Agrobacterium tumefaciens*.

Por “ADN-T”, o ADN transferido, se entiende que parte del vector de transformación flanqueado por los márgenes del ADN-T, después de la activación de los genes *vir* de *Agrobacterium*, se corta en los márgenes del ADN-T y se transfiere como un ADN monocatenario al núcleo de una célula eucariota. La producción de la cadena de ADN-T es el resultado de un acontecimiento de procesamiento del ADN iniciado por un corte específico de sitio en una molécula bicatenaria. Existe una familia de reacciones de procesamiento del ADN interrelacionadas en diferentes sistemas procariotas. En cualquier caso, el sustrato es una molécula de ADN circular superenrollada y la proteína de corte reconoce una secuencia corta, escinde en un sitio conservado (posiciones conservadas del sitio de corte y región consenso localizada en posición 3’ del corte) y se une covalentemente al margen 5’ de la cadena cortada. Los sistemas de procesamiento de ADN que pertenecen a esta familia incluyen, aparte de la formación de ADN-T en y la transferencia del ADN-T a la célula eucariota por *Agrobacterium*, (1) la iniciación de la replicación de ADN conjugativa y la posterior transferencia de plásmidos de bacterias Gram-negativas, (2) la iniciación de la síntesis de la cadena más durante la replicación por círculo rodante del fago relacionado con  $\phi$ X174, y (3) la iniciación de la replicación por círculo rodante en ciertos plásmidos de bacterias Gram-positivas (Waters y Guiney 1993). El acontecimiento de procesamiento del ADN se cataliza por un complejo oligoproteico relaxosoma. Una de las proteínas de este complejo, la relaxasa, es la enzima clave que cataliza la escisión del ADN específica de sitio y de cadena (Pansegrau y Lanka 1996). En el caso de la transferencia conjugativa de plásmidos, la relaxasa se une covalentemente al extremo 5’ del ADN a transferir y no es capaz de producir un segundo corte necesario para la transferencia de una única copia del ADN. Se cree que al menos es necesario un dímero de relaxasa para la transferencia de una única copia de ADN (Pansegrau y Lanka 1996).

En el caso de *Agrobacterium*, es necesario un mínimo de dos proteínas para el corte y la posterior transferencia del ADN-T. Estas proteínas del relaxosoma son VirD1 y VirD2. VirD1 es una topoisomerasa de tipo I sin especificidad de secuencia (Ghai y Das 1989). La proteína VirD2 es, también basándose en la homología de secuencia, la relaxasa de *Agrobacterium* y actúa como la endonucleasa de corte (Pansegrau *et al.* 1994). Durante el proceso de corte, VirD2 se une covalentemente a los dos extremos 5’ del ADN-T procesado en el margen derecho y al resto del plásmido de ADN-T en el margen izquierdo (Durrenberger *et al.* 1989, Young y Nester 1988). Tanto el margen izquierdo como el margen derecho del ADN-T se reconocen por VirD1 y VirD2. Se han demostrado interacciones fuertes entre VirD1 y VirD2 y entre proteínas VirD2 y se ha sugerido que el desplazamiento de la cadena de ADN-T (mediante la replicación del ADN) se detiene produciendo un segundo corte que depende de la interacción VirD2-VirD2. Esto implica que complejos de relaxosoma separados que incluyen al menos VirD1 y VirD2 podrían estar involucrados en el procesamiento de cada uno de los dos márgenes del ADN-T (Relic *et al.* 1998).

Por “márgenes de ADN-T”, “región del margen de ADN-T” o “región marginal” se entiende el margen del ADN-T derecho (RB), también denominado “margen derecho”, o el margen del ADN-T izquierdo (LB), también denominado “margen izquierdo”. Dicho margen comprende una secuencia central flanqueada por una región interna del margen como parte del ADN-T que flanquea el margen y/o una región externa del margen como parte del esqueleto del vector que flanquea el margen. Las secuencias centrales comprenden 22 pb en el caso de vectores de tipo octopina y 25 pb en el caso de vectores de tipo nopalina. Las secuencias centrales en la región del margen derecho y en la región del margen izquierdo forman repeticiones imperfectas. Las secuencias centrales del margen son indispensables para el reconocimiento y el procesamiento por el complejo de corte de *Agrobacterium* que consiste al menos en VirD1 y VirD2. Las secuencias centrales que flanquean un ADN-T son suficientes para promover la transferencia de dicho ADN-T. No obstante, la eficacia de la transformación usando vectores de transformación que llevan dicho ADN-T únicamente flanqueado por dichas secuencias centrales es baja. Se sabe que las regiones interna y externa del margen modulan la eficacia de la transferencia de ADN-T (Wang *et al.* 1987). Se ha caracterizado un elemento que potencia la transferencia de ADN-T y se encuentra en la región externa del margen derecho y se denomina *multiplicador*

## ES 2 335 614 T3

("overdrive") (Peralta *et al.* 1986, van Haaren *et al.* 1987). Las secuencias centrales son como sigue (in: parte de la secuencia de ADN-T; ex: parte de la secuencia del esqueleto del vector; secuencias centrales indicadas en mayúsculas en negrita y subrayado; Gielen *et al.* 1984, 1999):

- 5 - RB de tipo octopina: in-tgatgctgactGGCAGGATATATACCGTTGTAATttgatgctgct-ex (ID SEC N° 1)  
- LB de tipo octopina: ex-gcggcagcggcGGCAGGATATATTCAATTGTAAAtgcttcag-in (ID SEC N° 2)  
10 - RB de tipo nopalina: in-tatcagtgttTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACcctaagagaa-ex (ID SEC N° 3)  
- LB de tipo nopalina: ex-ggctggctgTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACaaattgacg-in (ID SEC N° 4)

15 Por "región integral del margen" se entiende un margen de ADN-T de origen natural que comprende la secuencia central del margen y tanto la región interna como la región externa del margen.

20 Por "vector de transformación de ADN-T" o "vector de ADN-T" se entiende cualquier vector que engloba una secuencia de ADN-T flanqueada por un margen derecho e izquierdo de ADN-T que consiste en al menos las secuencias centrales del margen derecho e izquierdo, respectivamente, y usado para la transformación de cualquier célula eucariota.

25 Por "secuencia del esqueleto del vector" o "secuencias del esqueleto del vector" se entiende todo el ADN de un ADN-T que contiene un vector que queda fuera de los márgenes del ADN-T y, más específicamente, fuera de los sitios de corte de las repeticiones imperfectas centrales del margen. Por "vector" se entiende un vector de transformación o un vector de ADN-T mantenido de manera estable en un cultivo bacteriano, por ejemplo, un cultivo de *Escherichia coli* o un cultivo de *Agrobacterium*.

30 La presente invención incluye construcciones de vectores de ADN-T optimizados de manera que se minimiza o se impide la integración del esqueleto del vector en el genoma de una célula eucariota o de manera que es posible la curación de las secuencias del esqueleto del vector integradas en una célula eucariota. Dichos vectores, cualquiera de sus derivados o cualquier vector que utiliza cualquiera de las modificaciones o cualquier combinación de modificaciones de la presente invención se puede usar como material de partida para la clonación de las secuencias de ADN de interés entre las dos repeticiones del margen y para aplicaciones posteriores, tales como la transformación de, por ejemplo, una planta cultivada, una levadura o un hongo y tal como terapia génica.

35 Por "vector de ADN-T optimizado" se entiende un vector de ADN-T diseñado para reducir o suprimir la transferencia de secuencias del esqueleto del vector al genoma de una célula eucariota o para permitir la curación de secuencias del esqueleto del vector transferidas al genoma de una célula eucariota.

40 En los análisis realizados en el marco de la presente invención (véanse los Ejemplos 1-3), se comparó la frecuencia de transferencia del esqueleto del vector en plantas transgénicas que se habían transformado con vectores de ADN-T con repeticiones en el margen en el contexto de la secuencia de octopina natural, y con vectores de ADN-T sin la región del margen interna de las repeticiones marginales. Se encontró sustancialmente más integración del esqueleto del vector en la serie de plantas transformadas en las que se emplearon vectores de ADN-T sin las secuencias internas y externas de repetición marginal que en la serie de plantas transformadas en las que se usaron regiones marginales completas interna y externa. Además, se observó que muchas plantas transgénicas contienen secuencias del esqueleto del vector unidas al margen izquierdo del ADN-T así como uniones del vector con el margen derecho del ADN-T (véase el Ejemplo 2). Los análisis de transferencia de ADN en gel indican que, en la mayoría de estas plantas, está integrada la secuencia completa del vector (véase el Ejemplo 3). Además, la frecuencia de integración de secuencias completas del esqueleto del vector no estaba influenciada por la presencia o ausencia de la región interna del margen.  
45 Estos datos sugieren que lo más probable es que la región interna del margen derecho no contenga determinantes importantes para el corte eficaz en el margen izquierdo del ADN-T. Esta conclusión se corrobora adicionalmente por resultados previos obtenidos por Shaw *et al.* (1984) que indican que la supresión de la región interna del RB no influye en la eficacia de la transformación de la planta. De esta manera, lo más probable es que los determinantes para el corte eficaz en el margen izquierdo del ADN-T residan dentro del propio LB. Se asume que la integración en el genoma de la planta de secuencias completas del esqueleto del vector es el resultado de una transferencia conjugativa iniciada en el margen derecho y continuada posteriormente con la copia en los márgenes izquierdo y derecho, denominado ultralectura. La transferencia del esqueleto del vector también puede ser la consecuencia del reconocimiento del LB como punto de partida para la transferencia de ADN y la copia continuada en el RB hasta el LB (van der Graaff *et al.* 1996). Por lo tanto, es importante identificar los elementos del LB involucrados en el corte eficaz en la repetición central del LB. De esta manera, por ejemplo, la supresión parcial o completa de la región interna del margen izquierdo y/o de las regiones externas podría poner a la repetición central del margen izquierdo en un contexto que potencia su afinidad y el reconocimiento por VirD1 y VirD2. Una observación llamativa con respecto a esto procede del análisis de las secuencias del margen izquierdo (y derecho) de los vectores de transformación usados en experimentos descritos en los Ejemplos 2 y 3. En la Figura 1 se representan los porcentajes de residuos de A y T por tramo de 100 pb alrededor (y sin incluir) las repeticiones centrales del LB y RB para los dos vectores de transformación con y sin el contexto de la región interna del margen natural. La observación singular consiste en el hecho de que el porcentaje de residuos AT de los 100 pb proximales al LB de la región interna natural (vector de ADN-T K de la Figura 1) es considerablemente superior al porcentaje de residuos AT de los 100 pb proximales al LB del vector en el que se suprime la región  
65

## ES 2 335 614 T3

interna natural (vector de ADN-T Hsb de la Figura 1), es decir, un 64% comparado con un 56%, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, la ultralectura del LB y la transferencia parcial del esqueleto del vector se produce con mucha más frecuencia cuando las plantas se transforman con vectores de ADN-T Hsb en comparación con la transformación de plantas con el vector de ADN-T K. Mecánicamente, es posible que este porcentaje inferior de residuos AT atenúe considerablemente la actividad de corte del relaxosoma unido al LB que incluye al menos VirD1 y VirD2. Simultáneamente, la maquinaria de replicación del ADN que lleva a cabo el desplazamiento de la cadena de ADN-T sería capaz, a frecuencias relativamente elevadas, de desplazar el relaxosoma del LB antes de que se haya realizado el corte. La consecuencia de este proceso sería una mayor frecuencia de ultralectura en el LB. De esta manera, el porcentaje de residuos AT de los 10-100 pb (o preferiblemente 20-100 pb) proximales al LB y parte del ADN-T es un elemento candidato del LB que determina la eficacia de corte en la repetición central del LB. Para que la eficacia del corte sea suficientemente elevada, el porcentaje de residuos AT de dicha región proximal del LB tiene que ser suficientemente elevado, es decir, al menos aproximadamente el 60-85%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 64-80%. Aunque los 100 pb proximales fuera de la repetición central del RB del ADN-T contienen un porcentaje similar de residuos AT que los 100 pb proximales en el interior de la repetición central del LB del ADN-T, es decir, el 58% comparado con el 56%, respectivamente (véase la Figura 1), el procesamiento correcto y altamente eficaz en el RB no es problemático. Lo más probable es que esto sea debido a la influencia positiva de la secuencia *multiplicadora* presente en la región externa del RB (Peralta *et al.* 1986, van Haaren *et al.* 1987). No se debe excluir que proteínas auxiliares al complejo del relaxosoma se unan a la secuencia *multiplicadora* y potencien el proceso de corte en el RB. Esto se asemejaría de nuevo a la situación de transferencia del plásmido conjugativo entre bacterias en las que se han identificado tales proteínas auxiliares (Waters y Guiney 1993). Tampoco se debe excluir que proteínas auxiliares, no identificadas hasta el momento, estén implicadas en el procesamiento eficaz del LB.

La primera construcción del vector de ADN-T modificada para prevenir la transferencia del esqueleto del vector descrita anteriormente incluye una región proximal del LB intra-ADN-T enriquecida en residuos de A y T. No obstante, tal estrategia no podrá ponerse en práctica para todas las construcciones de ADN-T. De esta manera, en la Figura 2 se representan esquemáticamente una serie de construcciones de vector de ADN-T optimizadas adicionales. Los resultados de la transformación de plantas con la primera de las construcciones de la Figura 2 se describen en los Ejemplos 1-3. Las otras construcciones sustentan varias estrategias para obtener vectores de ADN-T optimizados. Las optimizaciones residen en modificaciones del diseño del margen izquierdo enfocadas a incrementar la eficacia del corte del LB y que hacen que la integración del esqueleto del vector en el genoma de una célula eucariota esté muy minimizada o ausente. En dichas construcciones del vector de ADN-T optimizadas, la región del RB es constante, es decir, comprende la región externa del margen derecho pero se ha suprimido la región interna del margen derecho. Dicha región del margen derecho contiene la secuencia central del RB de 25 pb y los 146 pb cadena arriba de la región externa del margen derecho procedente de pTiAch5 (Gielen *et al.* 1984). Esta región externa contiene la secuencia *multiplicadora*. Está claro que en la presente invención también se pueden usar regiones del margen derecho en su contexto natural, es decir, que comprenden la región interna del margen derecho. Los márgenes derechos de los cuales se han eliminado las regiones internas del margen tienen la ventaja, no obstante, de que la transferencia a la planta de ADN "exógeno" sin una función clara y como parte del ADN-T está limitada adicionalmente. Además, se ha descrito anteriormente que es poco probable que la ausencia de la región interna del RB influya en la eficacia del procesamiento del LB. Las regiones del LB en dichos vectores de ADN-T optimizados ejemplares generalmente proceden de plásmidos Ti de tipo octopina y todas contienen una secuencia central natural del margen izquierdo. Los márgenes de ADN-T de tipo nopalina normalmente proceden de plásmidos Ti tales como el pTiC58 (Gielen *et al.* 1999). En la Figura 2 y en el Ejemplo 4 se describen más detalles sobre las regiones terminales ejemplares usadas en los vectores de ADN-T optimizados ejemplares.

La presente solicitud describe vectores de ADN-T optimizados como se ejemplifican en la Figura 2 y que incluyen una modificación del margen derecho del ADN-T que comprende una única secuencia central del margen derecho flanqueada por una región externa del margen derecho y/o una modificación, incluyendo la multiplicación, del margen izquierdo del ADN-T diseñados como:

- a) una única secuencia central del margen izquierdo flanqueada por una región externa natural del margen izquierdo y una región proximal del margen izquierdo intra-ADN-T con una longitud de 10 a 100 pb, preferiblemente 20-100 pb, y que está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT preferiblemente del 60 al 85%, siendo más preferiblemente del 64 al 80%, y siendo de la forma más preferida del 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78 ó 79%, siempre que dicha región proximal del margen izquierdo intra-ADN-T no sea la región interna del margen izquierdo de tipo octopina natural correspondiente, o
- b) una única secuencia central del margen izquierdo flanqueada solamente por una región interna natural del margen izquierdo, o
- c) una única secuencia central del margen izquierdo; o
- d) una repetición en tándem de varias secuencias centrales del margen izquierdo flanqueada solamente por una región externa natural del margen izquierdo, conteniendo preferiblemente la repetición en tándem 2-3 secuencias centrales del margen izquierdo pero sin excluir un mayor número de copias de la repetición imperfecta central del margen izquierdo y estando separadas dichas secuencias centrales del margen izquierdo

## ES 2 335 614 T3

repetidas en dicho tándem por una secuencia de al menos 10-20 pb que opcionalmente lleva codones de terminación en los tres marcos de lectura y en ambas direcciones; o

- 5 e) una región en el margen izquierdo de tipo nopalina integral adyacente a y cadena abajo o cadena arriba de la región en el margen izquierdo de tipo octopina integral.

La incorporación de regiones en el margen izquierdo modificadas que presentan un corte eficaz en la secuencia central del LB en vectores de transformación usados habitualmente prevendrá la ultralectura del LB. Una ventaja adicional de la disposición en tándem de las secuencias centrales del LB o de los márgenes izquierdos integrales radica en el hecho de que la ultralectura ocasional o la transferencia de ADN que comienza en la primera copia de dicha secuencia central del LB o en la región del LB integral se detendrá en una copia adyacente de dicha secuencia central del LB o región del LB integral en dicho tándem. En ambos casos, se reduce la frecuencia de transferencia de secuencias del esqueleto del vector y la integración de dichas secuencias en un genoma eucariota.

15 Por “cadena abajo” y “cadena arriba” se entiende cualquier secuencia localizada en posición 5’ y 3’, respectivamente, con respecto a cualquier otra secuencia. Como referencia, se toma la cadena de ADN-T que comienza en su extremo 5’ en el RB y termina en su extremo 3’ en el LB.

20 Se prevé una optimización adicional de los vectores de transformación del ADN-T una vez que se conozca si las regiones internas y/o externas del margen izquierdo son necesarias para evitar la integración del esqueleto del vector. Se pueden realizar varios derivados de supresión de dichas regiones internas y/o externas para determinar qué secuencia(s) específica en dichas regiones internas y/o externas del margen son importantes en la determinación de la terminación de la transferencia de ADN-T. Una vez que se conoce(n) esta(s) secuencia(s), se puede(n) incluir en más copias alrededor de la repetición del LB produciéndose como resultado un corte más eficaz. También son objeto de la presente invención tales márgenes izquierdos capaces de optimizar adicionalmente los vectores de transformación de ADN-T y dichos vectores que contienen dichos márgenes izquierdos modificados adicionalmente.

30 La presente invención expresa la incorporación de cualquier modificación descrita por la presente invención en cualquier vector de ADN-T que comprende vectores de transformación binarios, vectores de transformación superbinarios, vectores de transformación co-integrados, vectores de transformación derivados de Ri así como en vectores que llevan ADN-T usados en transformación agrolística o terapia génica.

Por “vector de transformación binario” se entiende un vector de transformación de ADN-T que comprende:

- 35 a) una región de ADN-T que comprende al menos un gen de interés y/o al menos un marcador de selección activo en la célula eucariota a transformar; y
- 40 b) una región del esqueleto del vector que comprende al menos orígenes de replicación activos en *E. coli* y *Agrobacterium* y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium*.

Como alternativa, la replicación del vector de transformación binario en *Agrobacterium* depende de la presencia de un plásmido auxiliar separado. El vector binario pGreen y el plásmido auxiliar pSoup forman un ejemplo de tal sistema como se describe en, por ejemplo, Hellens *et al.* (2000), Plant Mol. Biol. 42, 819-832, o como está disponible en el sitio de internet <http://www.pgreen.ac.uk>.

45 Los márgenes de ADN-T de un vector de transformación binario pueden proceder de plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos. El ADN-T de un vector binario sólo se transfiere a una célula eucariota junto con un plásmido auxiliar.

50 Por “plásmido auxiliar” se entiende un plásmido que se mantiene de manera estable en *Agrobacterium* y que al menos lleva el grupo de genes *vir* necesarios para permitir la transferencia del ADN-T. Dicho grupo de genes *vir* puede proceder de plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos.

55 Por “vector de transformación superbinario” se entiende un vector de transformación binario que lleva adicionalmente en la región del esqueleto del vector una región *vir* del plásmido Ti pTiBo542 de la cepa A281 supervirulenta de *A. tumefaciens* (documentos EP0604662, EP0687730). Los vectores de transformación superbinarios se usan junto con un plásmido auxiliar.

60 Por “vector de transformación co-integrado” se entiende un vector de ADN-T que comprende al menos:

- 65 a) una región de ADN-T que comprende al menos un gen de interés y/o al menos un marcador de selección activo en plantas; y
- b) una región del esqueleto del vector que comprende al menos orígenes de replicación activos en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y marcadores para la selección en *E. coli* y *Agrobacterium*.

Los márgenes de ADN-T y dicho grupo de genes *vir* de dicho vector de ADN-T pueden proceder de plásmidos Ti de tipo octopina o de tipo nopalina o de ambos.

## ES 2 335 614 T3

Por “vector de transformación en plantas derivado de Ri” se entiende un vector de transformación binario en el que los márgenes de ADN-T proceden de un plásmido Ti y dicho vector de transformación binario que se usa junto con un plásmido Ri “auxiliar” que lleva el grupo de genes *vir* necesarios.

5 Por “agrolística”, “transformación agrolística” o “transferencia agrolística” se entiende en el presente documento un método de transformación que combina las características de la transformación mediada por *Agrobacterium* y la administración biológica del ADN. Como tal, un ADN-T que contiene un plásmido diana se coadministra con ADN/ARN permitiendo en la planta una producción de VirD1 y VirD2 con o sin VirE2 (Hansen y Chilton 1996; Hansen *et al.* 1997; documento WO 97/12046).

10 Se reconocen dos posibles mecanismos que dan lugar a la transferencia e integración de secuencias del esqueleto del vector en un genoma eucariota. En un primer mecanismo, la transferencia de ADN-T comienza legítimamente en el margen derecho del ADN-T pero no se detiene en el margen izquierdo del ADN-T y se continúa por la copia continuada de secuencias del esqueleto del vector. Este mecanismo se conoce como ultralectura del margen izquierdo.  
15 En un segundo mecanismo, la transferencia de ADN se inicia ilegítimamente en el margen izquierdo del ADN-T con la copia continuada hasta que se alcanza de nuevo el margen izquierdo del ADN-T. Independientemente de qué mecanismo prevalezca, el análisis de plantas transgénicas indica que muchas de ellas tienen las secuencias completas del esqueleto del vector integradas en su genoma. La presente solicitud describe adicionalmente una estrategia para curar células transformadas que contienen secuencias del esqueleto del vector por recombinación en la que están  
20 implicados una recombinasa y sitios de recombinación.

Por “curación” se entiende en el presente documento la eliminación de secuencias del esqueleto del vector de transformación sin suprimir el acontecimiento de integración del ADN-T. Hanson *et al.* (1999) ha descrito otra herramienta para la eliminación de secuencias no pertenecientes al ADN-T de individuos transgénicos. No obstante, esta  
25 herramienta es diferente y no está relacionada con el método de curación descrito en la presente invención. Como se ha descrito anteriormente, la eliminación de secuencias no pertenecientes al ADN-T según los métodos de Hanson *et al.* (1999) o el documento WO 99/01563 tiene el inconveniente de reducir la eficacia de la transformación (Hanson *et al.* 1999).

30 De esta manera, la curación de células transformadas se obtiene mediante un acontecimiento de recombinación como método para la eliminación de las secuencias del esqueleto del vector integradas ilegítimamente. Como resultado, se obtienen células transformadas que retienen el ADN-T en su genoma. Al contrario que los métodos de Hanson *et al.* (1999) o el documento WO 99/01563, el método de curación de la presente invención rescata el ADN-T contenido  
35 en células transgénicas que previamente llevaban secuencias del esqueleto del vector integradas ilegítimamente. De esta manera, las eficacias de transformación apenas se ven afectadas.

Por “acontecimiento de recombinación” se entiende un acontecimiento de recombinación específico de sitio o un acontecimiento de recombinación llevado a cabo por “salto” de un transposón.

40 Por “recombinasa” se entiende una recombinasa específica de sitio o una transposasa.

Por “sitio de recombinación” se entienden sitios de recombinación específicos de sitio o secuencias terminales de transposones.

45 Por “acontecimiento de recombinación específico de sitio” se entiende un acontecimiento catalizado por un sistema que consiste generalmente en tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias o sitios de recombinación específicos de sitio) y una enzima específica (la recombinasa específica de sitio). La recombinasa específica de sitio cataliza una reacción de recombinación solamente entre dos secuencias de recombinación específicas de sitio que dependen de la orientación de las secuencias de recombinación específicas de sitio. Las secuencias intermedias entre  
50 dos sitios de recombinación específicos de sitio se invertirán en presencia de la recombinasa específica de sitio cuando las secuencias de recombinación específicas de sitio estén orientadas en direcciones opuestas entre sí (es decir, repeticiones invertidas). Si las secuencias de recombinación específicas de sitio están orientadas en la misma dirección entre sí (es decir, repeticiones directas), entonces cualquier secuencia intermedia se suprimirá tras la interacción con la recombinasa específica de sitio. De esta manera, si las secuencias de recombinación específicas de sitio están  
55 presentes como repeticiones directas en ambos márgenes de las secuencias del esqueleto del vector integradas en un genoma eucariota, tal integración de dichas secuencias se puede eliminar posteriormente mediante la interacción de las secuencias de recombinación específicas de sitio con la recombinasa específica de sitio correspondiente.

60 Se pueden usar varios sistemas de recombinasa específicos de sitio diferentes incluyendo, pero sin limitación, el sistema Cre/lox del bacteriófago P1, el sistema FLP/FRT de levadura, la recombinasa Gin del fago Mu, la recombinasa Pin de *E. coli*, la PinB, PinD y PinF de *Shigella*, y el sistema R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii*. Las recombinasas generalmente son integrasas, resolvasas o flipasas. También se pueden usar recombinasas específicas dobles junto con repeticiones directas o indirectas de dos sitios de recombinación específicos de sitio diferentes correspondientes a la recombinasa específica doble (documento WO 99/25840). Los sistemas recombinasa específicos de sitio preferidos  
65 son el Cre/lox del bacteriófago P1 y los sistemas FLP/FRT de levadura y R/RS de *Z. rouxii*. En estos sistemas, una recombinasa (Cre, FLP o R, respectivamente) interactúa específicamente con su respectiva secuencia de recombinación específica de sitio (lox, FRT o RS, respectivamente) para invertir o eliminar las secuencias intermedias. Las secuencias de recombinación específicas de sitio para cada uno de estos dos sistemas son relativamente cortas (34 pb para lox y 47

## ES 2 335 614 T3

pb para FRT). Algunos de estos sistemas ya se han usado con una eficacia elevada en plantas tales como el tabaco (Dale *et al.* 1990, Onouchi *et al.* 1991, Sugita *et al.* 2000) y *Arabidopsis* (Osborne *et al.* 1995, Onouchi *et al.* 1995). Los sistemas de recombinación específica de sitio tienen muchas aplicaciones en biología molecular de plantas incluyendo métodos para el control de la recombinación homologada (por ejemplo, documento US5527695), para la inserción dirigida, el apilamiento de genes, etc. (documento WO 99/25821) y para la resolución de patrones de integración de ADN-T complejos o para la escisión de un marcador de selección (documento WO 99/23202). En estas aplicaciones, los sitios de recombinación específicos de sitio normalmente son parte del ADN integrado en el genoma eucariota como ADN-T o mediante recombinación homóloga, y por lo tanto no están presentes en la secuencia del esqueleto del vector.

Aunque las secuencias de recombinación específicas de sitio deben estar unidas a los márgenes del ADN a escindir o a invertir, el gen que codifica la recombinasa específica de sitio puede estar localizado en otra parte. Por ejemplo, es posible que el gen de recombinasa ya esté presente en el ADN eucariota o se podría suministrar por un fragmento de ADN introducido después directamente en las células, por cruce o por polinización cruzada. Como alternativa, se podría introducir una proteína recombinasa sustancialmente purificada directamente en la célula eucariota, por ejemplo, mediante microinyección o bombardeo de partículas. Normalmente, la región que codifica la recombinasa específica de sitio estará unida operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión de la recombinasa específica de sitio en la célula eucariota.

Como parte de la presente invención, los sitios de recombinación específicos de sitio se introducen en el vector de ADN-T de manera que se encuentran fuera del ADN-T pero permiten la escisión post-transformacional de secuencias del esqueleto del vector transferidas o partes de las mismas que posiblemente se originan en dicho vector de ADN-T mediante la acción de una recombinasa específica de sitio.

Por “acontecimiento de recombinación realizado por salto de transposón” o “recombinación mediada por transposasa” se entiende un acontecimiento de recombinación catalizado por un sistema consistente en tres elementos: un par de secuencias de ADN (las secuencias marginales del transposón) y una enzima específica (la transposasa). La transposasa cataliza una reacción de recombinación solamente entre dos secuencias marginales del transposón que están dispuestas como repeticiones invertidas.

Se pueden usar varios sistemas transposón/transposasa diferentes incluyendo, pero sin limitación, el sistema Ds/Ac, el sistema Spm y el sistema Mu. Estos sistemas proceden de maíz, pero se ha demostrado que al menos el sistema Ds/Ac y el sistema Spm también funcionan en otras plantas (Fedoroff *et al.* 1993, Schlappi *et al.* 1993, van Sluys *et al.* 1987). Se prefieren los transposones de tipo Ds y Spm que están delimitados por secuencias marginales de 11 pb y 13 pb, respectivamente.

Aunque las secuencias marginales del transposón deben estar unidas a los extremos del ADN a escindir, el gen que codifica la transposasa puede estar localizado en otra parte. Por ejemplo, es posible que el gen de recombinasa ya esté presente en el ADN eucariota o se podría suministrar mediante un fragmento de ADN introducido después directamente en las células, por cruce o por polinización cruzada. Como alternativa, se podría introducir una proteína transposasa sustancialmente purificada directamente en las células, por ejemplo, mediante microinyección o bombardeo de partículas.

Se podrían introducir secuencias marginales del transposón en el vector de ADN-T de manera que se encuentren fuera del ADN-T y transformen el esqueleto del vector o una de sus partes en una entidad de tipo transposón que se puede mover mediante la acción de una transposasa. Como los transposones, y por lo tanto en la presente invención el esqueleto del vector o una de sus partes, a menudo se reintegran en otro locus del genoma del hospedador, podría ser necesaria la segregación de la progenie de los hospedadores en los que la transposasa se dejó actuar para separar los hospedadores transformados que solamente contienen el ADN-T y los hospedadores transformados que solamente contienen el esqueleto del vector o una de sus partes.

La presente solicitud además describe vectores de transformación de ADN-T optimizados con secuencias de ADN adicionales fuera de las repeticiones centrales del margen de ADN-T como se ejemplifica en la Figura 3 y que permiten la eliminación post-transformacional de secuencias integradas del esqueleto del vector. Dichas secuencias de ADN adicionales modifican, incluyendo multiplican, las regiones terminales de ADN-T o sus partes y comprenden:

- f) sitios de recombinación organizados como repeticiones cadena abajo de la secuencia central del margen izquierdo y cadena arriba de la secuencia central del margen derecho; o
- g) dichas secuencias de ADN de (f) modificadas adicionalmente mediante la adición de una segunda copia de una región de margen izquierdo situada cadena arriba de y preferiblemente adyacente a la única región externa del margen derecho y dicho sitio de recombinación cadena arriba de la secuencia central de dicha segunda región de margen izquierdo; o
- h) dichos sitios de recombinación de (f) con un gen de recombinasa, cadena abajo de dicho sitio de recombinación cadena abajo de la secuencia central del margen izquierdo, y preferiblemente, cuando está presente, adyacente a y cadena abajo de la región externa del margen izquierdo; o

## ES 2 335 614 T3

- i) una secuencia de ADN localizada cadena abajo de la región del margen izquierdo, comprendiendo dicha secuencia de ADN un gen de recombinasa flanqueado por repeticiones de sitios de recombinación como se ha definido en (h) y que comprende adicionalmente una segunda copia de una región del margen izquierdo cadena abajo de dicha recombinasa; o
- j) la secuencia de ADN de (i) con sitios de recombinación adicionales organizados como repeticiones cadena abajo de la segunda secuencia central del margen izquierdo y cadena arriba de la única secuencia central del margen derecho.

En cualquiera de dichas modificaciones (f), (g), (h), (i) o (j), dichos sitios de recombinación están localizados adyacentes a y cadena abajo y/o cadena arriba de las secuencias centrales del margen izquierdo y/o derecho o están separados de las secuencias centrales del margen izquierdo y/o derecho por una secuencia de al menos 10-20 pb de longitud que opcionalmente lleva codones de terminación en los tres marcos de lectura y en ambas direcciones.

En cualquiera de dichas modificaciones (f), (g), (h), (i) o (j), dichos sitios de recombinación son sitios de recombinación específicos de sitio dispuestos como repeticiones directas o secuencias terminales de transposones dispuestas como repeticiones invertidas y dicho gen de recombinasa es un gen de recombinasa específico de sitio o un gen de transposasa, respectivamente.

Es obvio que dichas modificaciones (f) o (g) en dichos vectores de transformación de ADN-T se deben considerar modificaciones simples, incluyendo la multiplicación de las regiones terminales de ADN-T o sus partes.

Se ha descrito la introducción de secuencias de ADN adicionales cadena abajo de la repetición central del margen izquierdo del ADN-T para prevenir la ultralectura en el margen izquierdo (documento WO 99/01563) o para eliminar secuencias que no pertenecen al ADN-T (Hanson *et al.* 1999) y estas secuencias previenen el desarrollo de transformantes que tienen secuencias integradas del esqueleto del vector. Además de dichas modificaciones (f), dicha modificación (g) del vector de ADN-T tiene la ventaja de que la ultralectura en la primera secuencia central del LB se puede detener en la segunda secuencia central del LB, previniendo así la duplicación del fragmento de ADN-T. Las secuencias del esqueleto del vector insertadas se eliminan posteriormente mediante la acción de una recombinasa apropiada. Además de dichas modificaciones (f), dicha modificación (h) introduce en un vector de ADN-T una secuencia de un gen de recombinasa cadena abajo de la secuencia central del margen izquierdo para permitir la resolución de la secuencia del esqueleto del vector integrada que posiblemente se origina en dicho vector de ADN-T en los sitios de recombinación introducidos en dichos márgenes del ADN-T modificados. De esta manera, y al contrario que en el documento WO 99/01563, los transformantes que tienen secuencias del esqueleto del vector integradas se pueden rescatar después de la curación, es decir, después de la eliminación de las secuencias del esqueleto del vector flanqueadas por los sitios de recombinación introducidos en dichos márgenes del ADN-T modificados. Simultáneamente, se escinde el gen de recombinasa.

Dichas modificaciones (i) además cambian el diseño de la región en el margen izquierdo, es decir, se añade una copia adicional de una región en el margen izquierdo. No obstante, las dos copias no están dispuestas en tándem como se ha descrito anteriormente en la primera estrategia para prevenir la integración del esqueleto del vector, sino que están separadas por el gen de recombinasa y las secuencias centrales del margen se encuentran en su contexto de margen más amplio. Dichas modificaciones (i) por lo tanto se deben considerar una modificación de la construcción del vector de ADN-T descrita anteriormente en la que la única región del LB contiene una disposición en tándem de la secuencia central del LB. La presencia de una segunda copia de una región del margen izquierdo del ADN-T tiene la ventaja de que se puede detener la transferencia de ADN ilegítima que comienza en o la ultralectura en la primera secuencia central del margen izquierdo en la segunda secuencia central del margen izquierdo. De esta manera, sólo se transfiere parte de la secuencia del esqueleto del vector al núcleo eucariota. Puesto que esta región del esqueleto del vector está flanqueada por sitios de recombinación, se puede eliminar fácilmente por medio de la acción de una recombinasa. No obstante, aún se puede producir la transferencia de ADN ilegítima que comienza en o la ultralectura en la segunda copia de la secuencia central del margen izquierdo.

Por lo tanto, dicha modificación (j) además añade un par de sitios de recombinación cadena abajo de la segunda copia de la secuencia central del margen izquierdo y cadena arriba de la única región del margen derecho. Las secuencias del esqueleto del vector integradas de nuevo se pueden eliminar fácilmente mediante la acción de una recombinasa en los sitios de recombinación. En el caso de la transferencia de ADN ilegítima que comienza en la segunda copia de la secuencia central del margen izquierdo, la recombinasa no se suministrará mediante el esqueleto del vector de transformación de ADN-T. Por lo tanto, se debe suministrar de otra parte, por ejemplo, por cruce sexual con una planta que ya contiene el gen de recombinasa en su genoma.

Cualquiera de dichas modificaciones (f), (g), (h), (i) o (j) también es aplicable para curar células transgénicas de secuencias del esqueleto del vector integradas en el genoma de un eucariota independientemente del ADN-T, es decir, no unidas físicamente al ADN-T.

En la presente solicitud además se describe un método que usa dichos vectores de transformación de ADN-T que contienen dichas secuencias de ADN de (f) o (g) en combinación con el suministro de una recombinasa, o que usa dichos vectores de transformación de ADN-T que contienen dichas secuencias de ADN (h), (i) o (j) para la curación de células transformadas que contienen secuencias del esqueleto de dichas secuencias del esqueleto del vector opcionalmente en combinación con el suministro de una recombinasa.

## ES 2 335 614 T3

Las recombinasas específicas de sitio o transposasas introducidas en el genoma del hospedador para permitir la recombinación se pueden eliminar posteriormente mediante la segregación de la progenie del hospedador transformado en el que se ha permitido que se produzca la recombinación. La segregación de dicha progenie también es una manera de separar hospedadores transformados que contienen solamente el ADN-T y hospedadores transformados que contienen solamente el esqueleto del vector o sus partes.

La presente invención además expresa la incorporación de cualquiera de dichas secuencias de ADN adicionales en cualquier vector de ADN-T que comprende vectores de transformación binarios, vectores de transformación superbinarios, vectores de transformación co-integrados, vectores de transformación derivados de Ri así como en vectores que llevan ADN-T usados en transformación agrolística o terapia génica.

Como se describe en esta memoria descriptiva, el gen de recombinasa se suministra a las plantas transgénicas que contienen una secuencia del esqueleto del vector flanqueada por sitios de recombinación mediante cruce sexual con una planta que contiene el gen de recombinasa en su genoma.

Dicha recombinasa puede estar unida de manera operativa a un promotor constitutivo o inducible. El gen de recombinasa, como alternativa, puede estar bajo el control de una única subunidad de promotores específicos de la ARN polimerasa de bacteriófago, tales como un promotor específico de T7 o T3, siempre que las células hospedadoras también comprendan la ARN polimerasa correspondiente en una forma activa. Otro método alternativo más para la expresión de la recombinasa consiste en la unión de manera operativa del marco de lectura abierto de la recombinasa con una secuencia de activación cadena arriba inducida por un factor de transcripción de transactivación tal como GAL4 o sus derivados (documentos US5801027, WO 97/30164 y WO 98/59062) o el represor Lac (documento EP0823480), siempre que la célula hospedadora se suministre de una forma apropiada con el factor de transcripción.

Como se describe adicionalmente en esta solicitud, el gen de recombinasa se suministra en el esqueleto del vector de transformación y el promotor de dicho gen de recombinasa preferiblemente es un promotor inducible. Tales promotores son conocidos por los familiarizados con la técnica e incluyen, por ejemplo, un promotor sensible al choque térmico, un promotor inducible por glucocorticoides o un promotor inducible por otro compuesto químico (por ejemplo, como se describe en los documentos EP0332104 y WO 90/08826).

En particular, se impide la expresión del gen de recombinasa en hospedadores bacterianos incluyendo una(s) secuencia(s) de intrón en la región codificante de dicho gen de recombinasa.

Es conocido en la técnica que niveles aumentados de VirD1 y VirD2 en *Agrobacterium* dan lugar a mayores niveles de transformación de la planta (Wang *et al.* 1990). VirD1 y VirD2 también se han integrado en un método para mejorar la integración de ADN exógeno administrado a células eucariotas por medio de la transformación de dicha célula eucariota con genes *virD1* y/o *virD2* quiméricos (documento WO 97/12046). No obstante, hasta ahora no se ha demostrado que una producción incrementada de VirD1 y/o VirD2 pueda prevenir la integración de secuencias del esqueleto del vector.

De esta manera, la integración de la secuencia del esqueleto del vector se previene aumentando la eficacia del corte en la secuencia central del margen izquierdo de un vector de ADN-T incrementando la producción del complejo de corte de ADN-T en el que están implicadas al menos las endonucleasas VirD1 y VirD2.

Se pueden integrar copias adicionales del locus *virD* de tipo octopina en el genoma de *Agrobacterium* y/o en un plásmido auxiliar y/o en un vector de transformación binario y/o en un vector de transformación superbinario y/o en un vector de transformación co-integrado y/o en un vector de transformación de plantas derivado de Ri. Como se ha mencionado, también se pueden suministrar copias adicionales del locus *virD* de tipo nopalina.

La presente solicitud por lo tanto presenta tres métodos para prevenir o curar la integración de secuencias del esqueleto del vector de transformación y el uso de:

- 1) cualquiera de los vectores de ADN-T (a) a (e) modificados en la región en el margen izquierdo del ADN-T de manera que se previene o se detiene la ultralectura o se previene o se detiene la transferencia de ADN que comienza en este margen; o
- 2) cualquiera de los vectores de ADN-T (f) a (j) que permite la resolución de secuencias del esqueleto del vector de transformación integradas en el genoma de células transgénicas por medio de recombinación; o
- 3) al menos una copia extra del locus *virD* en *Agrobacterium* para incrementar los niveles de VirD1 y VirD2 como constituyentes mínimos del complejo de corte en el margen de ADN-T.

Está claro para los familiarizados con la técnica que cualquiera de estos métodos o sus partes se puede usar solos, en combinaciones de dos, o como una combinación de los tres. Los diseños de un vector de ADN-T ejemplar que reflejan algunas de tales combinaciones se proporcionan en la Figura 3.

Las combinaciones preferidas de los métodos de la invención (1) o (2) con el método de la invención (3) consisten en un vector de transformación que lleva una región de LB modificada que contiene una disposición en tándem de la

## ES 2 335 614 T3

secuencia central del LB o múltiples copias de la región del LB y la producción potenciada de VirD1 y VirD2 por *Agrobacterium*. De hecho, se puede esperar que el tándem de las secuencias centrales del LB o las múltiples copias de la región del LB titulen las proteínas VirD1 y VirD2 disponibles en una cepa de *Agrobacterium* usada normalmente para la transformación. Como resultado, estas proteínas ya no estarán disponibles durante más tiempo para establecer el corte en la única secuencia central del RB.

La solicitud también describe el uso de cualquiera de dichos métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T para prevenir o curar la integración del esqueleto del vector de transformación por separado o en cualquier combinación. Las combinaciones preferidas son aquellas en las que se dejan actuar niveles potenciados de proteínas VirD producidas por *Agrobacterium* sobre vectores de ADN-T que albergan múltiples copias de la secuencia central del LB o múltiples copias de las regiones en el LB.

También está claro que se puede combinar cualquiera de dichos métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T para prevenir o curar la integración del esqueleto del vector con cualquier otro método que previene o cura la integración del esqueleto del vector. Tales métodos y modificaciones del vector de ADN-T incluyen la adición de genes o secuencias de ADN cadena abajo del margen izquierdo, por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/01563. Tales genes/secuencias de ADN incluyen genes que codifican compuestos citotóxicos, genes de mantenimiento anti-sentido, secuencias que impiden el desenrollamiento del ADN detrás de la región del margen izquierdo, por ejemplo secuencias con un elevado contenido en GC o secuencias con la caja *vir* que interactúan con las proteínas de unión al ADN.

De esta manera, la presente solicitud describe el uso de cualquiera de los métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T de la presente invención para prevenir o curar la integración de secuencias del esqueleto del vector de transformación en combinación con cualquier otro método y/o la modificación del vector de transformación de ADN-T para prevenir o curar la integración del esqueleto del vector de transformación.

Además estará claro para el especialista en la técnica que cualquiera de los métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T de la presente invención para curar la integración de secuencias del esqueleto del vector de transformación se puede combinar con cualquier otro método y/o modificación del vector de ADN-T usando o incorporando cualquier sistema de recombinación, por ejemplo, para escindir marcadores seleccionables activos en plantas. De hecho, dicho método de curación se puede combinar con, por ejemplo, la escisión de un marcador de selección flanqueando el marcador de selección ejemplar con el mismo o con diferentes sitios de recombinación que los que flanquean la secuencia del esqueleto del vector. En dicho método de curación, la secuencia del esqueleto del vector también puede estar flanqueada por dos sitios de recombinación específicos de sitio diferentes y la curación se puede llevar a cabo mediante una recombinasa específica doble con especificidades que se corresponden con los sitios de recombinación específicos de sitio usados.

La solicitud además describe el uso de los métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T de la presente invención para curar la integración de secuencias del esqueleto del vector de transformación en combinación con métodos y/o modificaciones del vector de ADN-T que usan o incorporan cualquier sistema de recombinación para fines distintos de la curación de la integración de la secuencia del esqueleto del vector.

La solicitud también describe la curación de secuencias del esqueleto del vector de transformación integradas que implica la modificación de los márgenes del ADN-T añadiendo cualquier par de sitios de recombinación específicos de sitio mutuamente diferentes y el uso junto con al menos una recombinasa específica doble con especificidades correspondientes al menos a los sitios de recombinación específicos de sitio usados.

En otra realización de la invención, cualquiera de dichas construcciones del vector de ADN-T de acuerdo con la invención se moviliza a una cepa de *Agrobacterium*. Las cepas resultantes también constituyen la invención.

En otra realización más de la invención, cualquiera de dichos vectores de ADN-T de acuerdo con la invención se usa en una transformación mediada por *Agrobacterium* o agrolística, siendo dichos métodos de transformación conocidos por el especialista en la técnica. Dichos vectores de ADN-T de acuerdo con la invención se pueden usar para transformar varios tejidos de plantas que comprenden raíces, protoplastos, hojas, etc. de diferentes especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas tales como, pero sin limitación, *Arabidopsis*, tabaco, petunia, tomate, patata, judías, arroz y trigo. Más en general, puede ser cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea, que pertenece preferiblemente a una especie de plantas de interés en agricultura, cultivo de madera, horticultura o a una especie de plantas aplicada a la producción de productos farmacéuticos, bioquímicos, anticuerpos o perfumes. Tales plantas incluyen plantas cultivadas, plantas de raíz, plantas que producen aceites, plantas que producen madera, plantas agrícolas, plantas que producen frutos, pasto o legumbres de forraje, plantas domésticas o plantas de horticultura. Estas plantas además incluyen albaricoque, alcachofa, espárrago, manzana, plátano, cebada, brócoli, coles de Bruselas, repollo, canola, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cereza, escarola, berzas, algodón, abeto Douglas, abeto (especies *Abies* y *Picea*), lino, ajo, uvas, col rizada, lenteja, maíz, roble, avena, aceite de colza, kimbombó, cebolla, pera, pimienta, álamo, centeno, sorgo, soja, calabaza, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol.

Dichos vectores de ADN-T de acuerdo con la invención también se pueden usar en combinación con el método de transformación de plantas por inmersión de las flores (Clough y Bent 1998) o con el método de transformación de brotes apicales en plantas (documento WO 99/14348). Dichos vectores de ADN-T de acuerdo con la invención tam-

bién se pueden usar para transformar otras células eucariotas incluyendo levaduras, mohos y hongos filamentosos y sus conidios, hifas o protoplastos derivados de ellos. La transformación mediada por *Agrobacterium* de dichas células eucariotas es conocida por los especialistas en la técnica (por ejemplo, documento WO 98/45455). Una característica clave de las células eucariotas transformadas mediante transferencia mediada por *Agrobacterium* o transferencia agrolística de cualquiera de los vectores de transformación de ADN-T de la invención es una frecuencia significativamente reducida de secuencias del esqueleto del vector integradas sin afectar mucho a la frecuencia de integración de secuencias de ADN-T.

Una realización preferida de la invención comprende células de plantas transgénicas obtenidas mediante cualquier método de transferencia mediada por *Agrobacterium* o transferencia agrolística de cualquiera de los vectores de transformación de ADN-T de la invención. También están comprendidas las plantas transgénicas obtenidas o regeneradas mediante cualquier método después de cualquier método de transferencia mediada por *Agrobacterium* o transferencia agrolística de cualquiera de los vectores de transformación de ADN-T de la invención. Tales plantas se caracterizan por que contienen secuencias de ADN-T, pero no secuencias del esqueleto del vector, en su genoma. Además está comprendida la descendencia de dichas plantas transgénicas así como las células, protoplastos, callos, tejidos, órganos, semillas, frutas, polen, huevos, cigotos, embriones zigóticos o somáticos derivados de ellas o derivados de células de dicha planta transgénica.

La posibilidad de usar vectores que llevan ADN-T de acuerdo con la presente invención en terapia génica se puede explicar como sigue. Se ha descrito que complejos reconstituidos *in vitro* que consisten en VirD2-ADNss-VirE2 son capaces de transferir el ADNss intacto a núcleos de mamífero (Ziemienowicz *et al.* 1999).

La proteína VirD2 protege al ADNss frente a la degradación exonucleolítica debido a que está unida covalentemente al extremo 5' del ADNss (Durrenberger *et al.* 1989, Young y Nester 1988) y, por medio de dos secuencias de localización nuclear (NLSs), dirige el ADNss al núcleo de la célula de la planta (Narasimhulu *et al.* 1996, Rossi *et al.* 1993, Shurvinton *et al.* 1992). La proteína VirD2 además contiene un dominio "omega" importante para la integración eficaz del ADN-T en el genoma del hospedador (Narasimhulu *et al.* 1996, Mysore *et al.* 1998, Tinland *et al.* 1995). Se ha demostrado que las NLSs de VirD2 son activas en células animales incluyendo células HeLa humanas, embriones de *Drosophila* y oocitos de *Xenopus* (Guralnick *et al.* 1996, Ziemienowicz *et al.* 1999). La proteína VirD1 permanece localizada en el citoplasma de las células de mamífero pero se puede importar al núcleo mediante un mecanismo de remolque que implica a la proteína VirD2 (Ziemienowicz *et al.* 1999).

La proteína VirE2 protege al ADNss frente a la degradación (endo)nucleolítica y preserva la integridad del ADN-T (Gelvin 1998b, Rossi *et al.* 1996). La proteína VirE2 además está activamente involucrada en la dirección del ADN-T al núcleo de la planta (Gelvin 1998b). Las NLSs de VirE2 pueden ser específicas de la planta, pero el reposicionamiento de un único aminoácido dentro de las NLSs de VirE2 dirige estas proteínas modificadas al núcleo de células animales (Guralnick *et al.* 1996). Las proteínas VirE2 interactúan entre ellas, pero la interacción de VirE1 con VirE2 es mucho más fuerte y VirE1 inhibe la auto-interacción de VirE2. En células de *Agrobacterium*, VirE1 previene la agregación de VirE2. Por lo tanto, la proteína VirE1 parece funcionar como una chaperona molecular de VirE2 (Deng *et al.* 1999).

Las características de estas proteínas Vir hacen que sean candidatas ideales para su aplicación en experimentos de terapia génica como indica Ziemienowicz *et al.* (1999). De hecho, uno de los problemas principales en terapia génica consiste en la dificultad de administrar ADN a través de las barreras intracelulares que incluyen la degradación nucleolítica y la captación nuclear.

Los vectores virales son uno de los vehículos principales usados por los científicos en terapia génica para conseguir una secuencia de ADN expresada en el hospedador apropiado. Los vectores retrovirales (incluyendo el VIH y MMLV) se emplean en el 63% de los protocolos de terapia génica aprobados por el Recombinant DNA Advisory Committee (una división del NIH) mientras que los vectores adenovirales se usan en el 16% de esos protocolos. Otros vectores virales incluyen los basados en AAV, HSV y *Vaccinia*. Los vectores virales forman un área de nuevo desarrollo continuo en terapia génica.

Se puede prever que los genes para las proteínas de *Agrobacterium* VirD1, VirD2 y VirE2 (y eventualmente VirE1) se incorporen en un vector viral de tal forma (es decir, incluyendo el uso de codones adaptado y las secuencias reguladoras apropiadas) que se puedan expresar en células animales, preferiblemente de manera transitoria, preferiblemente sin la integración de dichos genes *vir* en el genoma del hospedador. Si un ADN-T que contiene el gen de interés para fines de terapia génica, está presente en el mismo vector viral o se co-administra en un vector viral aparte u otro tipo de vector viral, dicho ADN-T se podría transferir eficazmente a continuación al genoma en los núcleos de células animales. Un requisito estricto para la aprobación de tal estrategia de terapia génica sería, no obstante, que sólo el ADN-T, y no cualquier otro ADN externo, se transfiera al núcleo. Cualquier modificación presentada en la presente invención para prevenir o curar la transferencia de secuencias de ADN que no pertenecen al ADN-T sería por lo tanto de gran valor para incrementar la aceptabilidad de estrategias de terapia génica que incluyen el uso de proteínas de *Agrobacterium* para proporcionar y transferir el ADN de interés. Por lo tanto, los vectores que llevan el ADN-T modificados de acuerdo con cualquiera de las modificaciones o cualquier combinación de modificaciones de la presente invención y que se usan con fines de terapia génica están incluidos en la presente invención.

Además, está claro para los facultativos especialistas que al menos los vectores de ADN-T de acuerdo con la presente invención y que comprenden LB modificados que dan como resultado un corte muy eficaz en este LB se

pueden utilizar como fuente de, por ejemplo, complejos de VirD2-ADN-Tss-VirE2 que se pueden usar en otras técnicas de terapia génica incluyendo microinyección, electroporación, administración mediada por un vehículo e inyección balística de ADN. Dichos complejos se podrían enriquecer en, por ejemplo, cultivo de *Agrobacterium* inducido por acetosiringona o un cultivo de *E. coli* que expresa al menos las proteínas VirD1, VirD2 y VirE2 por medio de, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando un anticuerpo que reconoce la proteína VirD2.

La invención, que hasta ahora se ha descrito de manera general, se puede entender más claramente en referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten la invención. Los contenidos de todas las referencias mencionadas en este texto se incorporan en el presente documento como referencia.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática del porcentaje de residuos de A y T (indicado por encima y por debajo de la línea horizontal que indica el vector) por bloques de 100 pb alrededor de (y que no incluyen) las repeticiones imperfectas centrales del margen izquierdo y derecho de los vectores de ADN-T K y Hsb descritos y usados en los Ejemplos 1-3.

Figura 2. Representación esquemática de construcciones de ADN-T diseñadas para valorar la eficacia del corte en el margen izquierdo modificado junto con un margen derecho que carece de la región interna del margen. *Gus*: secuencia que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa; *nptII*: secuencia que codifica la neomicina fosfotransferasa II; 3' *ocs*: terminador en 3' del gen de la octopina sintasa; Pnos: promotor del gen de la nopalina sintasa; 3' nos: terminador 3' del gen de la nopalina sintasa; P35S: promotor constitutivo del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Figura 3. Representación esquemática de construcciones de ADN-T diseñadas para permitir la curación de secuencias del esqueleto del vector integradas en el genoma de un eucariota.

LB: margen izquierdo, RB: margen derecho.

Figura 4. Representación esquemática de construcciones de ADN-T ejemplares que representan combinaciones de modificaciones de acuerdo con la presente invención. LB: margen izquierdo, RB: margen derecho; LBmod: margen izquierdo modificado (véase la Figura 2 para posibles modificaciones).

Figura 5. Análisis de transferencia de ADN en gel.

(A) Representación esquemática de la digestión y la sonda usada en el análisis de transferencia de ADN en gel (no representado a escala). Cada muestra de ADN genómico de la planta y los plásmidos usados como controles positivos se digirieron con *KpnI* y *SacI*, ambos que cortan en el esqueleto del vector fuera del LB y el RB. Como sonda se usó la secuencia del vector del plásmido K, mostrado como una barra sombreada, después de la restricción con *KpnI* y *SacI*.

(B) Análisis de transferencia de ADN en gel. Los vectores de ADN-T de los cuales al menos 1000 pb del esqueleto del vector se encontraron mediante análisis de PCR de las plantas transgénicas se indican en la parte superior de cada calle. Se observa un fragmento de 8476 pb (flecha 1) cuando se integra toda la secuencia del esqueleto del vector del plásmido K (K1 y K2 llevan un gen estructural diferente en su ADN-T pero además son idénticos), mientras que se detectan fragmentos de 7066 pb (flecha 2) cuando se integra toda la secuencia del esqueleto del vector del plásmido Hsb. Los plásmidos de ADN-T K y Hsb se describen en el Ejemplo 1.

Las muestras de ADN genómico en las calles 1, 2 y 5 proceden de plantas en experimentos distintos a aquellos descritos.

Calle C. El ADN genómico de *A. thaliana* sin transformar.

Calles de plásmidos: Contienen ADN puro de los plásmidos indicados digeridos con *KpnI* y *SacI*.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

*Transformación de A. thaliana (L.) Heynh y Nicotiana tabacum (L.)*

Se usaron los plásmidos pK2L610 (vector de ADN-T "K"; De Buck *et al.* 1998), pSingle gus (vector de ADN-T "Ksb1"; véase a continuación) y pHSB610 (vector de ADN-T "Hsb"; De Buck *et al.* 1999) para la transformación de la planta. El vector pSingle gus ("Ksb1") es similar al vector pHSB610 ("Hsb") excepto porque el fragmento Pnos-hpt-3'nos de pHSB610 ("Hsb") se intercambia por un casete de Pnos-nptII-3'nos en pSingle gus ("Ksb1"). Como marcador de selección para la transformación de la planta, los vectores K y Ksb1 contienen el gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) y el vector Hsb contiene el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hpt*). La *A. thaliana* se

## ES 2 335 614 T3

co-transformó con los plásmidos K y Hsb según el método de transformación de la raíz de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium* (De Buck *et al.* 1999, Valveken *et al.* 1988). El tabaco (*N. tabacum*) se transformó con el plásmido Ksb según el método de transformación del disco de la hoja mediada por *Agrobacterium* (Horsch *et al.* 1985). Las plantas transgénicas se regeneraron en un medio que contenía las hormonas de crecimiento de la planta apropiadas y el agente selectivo apropiado. En la serie 1, se obtuvieron 18 plantas de *A. thaliana* transgénicas se cotransformadas con los vectores de ADN-T K y Hsb. En la serie 2, se obtuvieron 36 plantas de *N. tabacum* transformadas con el vector de ADN-T Ksb.

### 10 Ejemplo 2

#### *Integración de secuencias del esqueleto del vector valorada por PCR*

Para el análisis por PCR, el ADN se aisló a partir del material de la hoja de *N. tabacum* como se describe por Jones *et al.* (1985) y a partir de *A. thaliana* según De Neve *et al.* (1997). Para seleccionar las plantas transgénicas en la integración de secuencias del vector, se realizaron diferentes reacciones de PCR. El ADN (100 ng) se incubó con 500 ng de cada cebador en tampón de incubación de *Taq* polimerasa 1x (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica). Se añadieron dos unidades y media de *Taq* polimerasa hasta un volumen final de 100  $\mu$ l. Las muestras se calentaron a 94°C durante 5 minutos antes de la PCR. La desnaturalización se produjo a 94°C durante 1 minuto. La hibridación se produjo durante 2 minutos a 57°C, y la reacción de extensión fue a 72°C durante 5 minutos, mientras que se realizaron 30 ciclos. Las combinaciones del cebador se escogieron de manera que la presencia de al menos 100 pb ("RB100" y "LB100" en las Tablas 1 y 2) o al menos 1000 pb ("RB1000" y "LB1000" en las Tablas 1 y 2) del esqueleto del vector dieran como resultado un fragmento de PCR diagnóstico de tamaño conocido. Para asegurarse de que el producto amplificado por PCR no procedía de la contaminación con células de *Agrobacterium* que aún estaban presentes en el tejido de la planta, se llevó a cabo una reacción de PCR sobre cada ADN con dos cebadores específicos para el gen cromosómico de *A. tumefaciens picA* (Yusibov *et al.* 1994).

La serie 1 de plantas de *A. thaliana* contiene 18 plantas transgénicas co-transformadas con los vectores de ADN-T K y Hsb. El vector K contiene márgenes en el contexto de la octopina natural con regiones marginales internas y externas de 150 pb y 255 (RB) - 300 (LB) pb, respectivamente, mientras que el vector Hsb contiene solamente las regiones marginales externas. La selección para la integración de secuencias del esqueleto del vector reveló que se encontraron secuencias del vector procedentes de los ADN-T K y Hsb en el 33% (6/18) y en el 61% (11/18) de las plantas transgénicas, respectivamente. Sólo en un transformante, las secuencias del vector no estaban unidas al ADN-T. No se detectaron diferencias importantes en las frecuencias del vector unido a la región RB del Hsb (6/18) y la región RB (4/18) del plásmido K (véase Tabla 1). No obstante, se integró mucho más vector en la región LB del ADN-T Hsb (11/18) que del ADN-T K. En todos los casos, en los que un ADN-T integrado contiene secuencias del vector en el RB, también se pudieron detectar secuencias del vector en el LB.

La serie 2 de plantas del tabaco contiene 36 plantas transgénicas transformadas con un vector Ksb. Este vector también contiene RB y LB sin regiones terminales internas y por lo tanto es comparable al vector Hsb. En el 53% (19/36) de los transformantes analizados (véase la Tabla 2) se encontraron secuencias del vector; éstas estaban unidas solamente al LB (8/19), solamente al margen derecho del ADN-T (1/19), o a ambos márgenes (10/19).

En otra serie de transformantes de tabaco que contiene el ADN-T Ksb (datos no mostrados), el 81% de los transformantes (21/26) contenía secuencias del vector unidas al LB y el 61% (16/26) unidas al RB (datos no mostrados). No obstante, sorprendentemente, de estos 16 transformantes que contenían las secuencias del esqueleto del RB, 15 de ellos también contenían secuencias del vector del LB integradas (datos no mostrados).

Tomados juntos, en las tres series diferentes de transformantes en las que se usó un vector de ADN-T sin secuencias terminales internas, más del 50% de los transformantes contenían ADN del esqueleto del vector. Muy pocos transformantes contenían ADN del vector unido solamente al margen derecho del ADN-T. En general, cuando estaba presente el ADN del vector unido al margen derecho, también se pudo detectar ADN del vector unido al margen izquierdo del ADN-T. Esto implica que especialmente la ultralectura en la repetición marginal izquierda, debido al corte ineficaz, es responsable de la integración de secuencias del esqueleto del vector. Es posible que la supresión de la región terminal interna, un trozo de ADN-T presente en el plásmido Ti original del cual procede el vector, provoque el corte ineficaz de la repetición del LB, que da como resultado la ultralectura más allá del LB y la transferencia de secuencias del vector localizadas cadena abajo. Por consiguiente, Horsch y Klee (1986) observaron que la velocidad global de transferencia a plantas de plásmidos que solamente contienen la repetición de 25 pb no es tan elevada como con los fragmentos más largos del margen procedente de Ti, lo que sugiere que secuencias adicionales que rodean las repeticiones en el margen desempeñan algún papel en la transferencia. No obstante, estos autores no han abordado la cuestión de la posible integración de secuencias del esqueleto del vector en plantas transgénicas usando dicho vector.

## ES 2 335 614 T3

### Ejemplo 3

#### *Integración de secuencias del esqueleto del vector valorada por transferencia de ADN en gel*

5 El análisis de transferencia de ADN en gel se llevó a cabo esencialmente según Maniatis *et al.* (1982) sobre 0,6  $\mu\text{g}$  aproximadamente de ADN genómico. Los sitios de restricción usados (*KpnI-SacI*) se indican en la Figura 5A. Como sonda, se usó la secuencia del vector del plásmido K después de la restricción con *KpnI* y *SacI*. Se usaron el módulo de marcaje de cebado aleatorio "Gene images" no radiactivo y el módulo de detección "Gene images" CDP Star (Amersham, Aylesburg, RU) para la hibridación y la detección, respectivamente.

10 Como se resume en el Ejemplo 2, se observó la unión de ambas regiones en el RB y LB a al menos un fragmento del esqueleto del vector de 1000 pb de uno o ambos plásmidos en diferentes transformantes de la serie 1 (véase la Tabla 1). Para determinar si el plásmido de ADN-T binario completo (ADN-T + secuencias del esqueleto del vector) se integra en el genoma de estos transformantes, se llevó a cabo un análisis de transferencia de ADN en gel con la secuencia del vector K como sonda. Cuando está presente toda la secuencia del vector, la restricción del ADN genómico con *KpnI* y *SacI* daría como resultado la detección de un fragmento de 8467 pb aproximadamente para K (flecha 1 en la Figura 5B) y de 7066 pb para Hsb (flecha 2 en la Figura 5B). El análisis de transferencia de ADN en gel proporcionado en la Figura 3B demuestra que en 10 de las 11 plantas analizadas, toda la secuencia del esqueleto del vector se integró en el genoma de la planta. Las muestras en las calles 1, 2 y 5 proceden de plantas en experimentos distintos a los descritos. 20 Estos resultados sugieren que con frecuencia se integran secuencias completas del vector en el genoma de la planta.

### Ejemplo 4

#### *Construcción de vectores de ADN-T optimizados con márgenes izquierdos modificados*

Se construyeron como sigue vectores de ADN-T binarios optimizados ejemplares con modificaciones de los tipos indicados en la Figura 2.

30 En este ejemplo, todos los vectores de ADN-T binarios optimizados descritos en este ejemplo proceden del pTHW136. El vector binario pTHW136 contiene secuencias centrales del margen derecho e izquierdo de tipo octopina que forman una repetición imperfecta, cada una flanqueada por regiones externas marginales de tipo octopina que proceden de pTi15955 (224 pb en el caso de la región externa del RB y 268 pb en el caso de la región externa del LB). Sobre el ADN-T de pTHW136 está localizado un casete de expresión GUS-intrón (promotor de 35S - marco de lectura abierta de GUS interrumpido por un intrón - terminador de 35S) y un gen marcador de selección *nptII* (promotor de nos - marco de lectura abierta *nptII* - terminador de ocs).

40 Para crear vectores de ADN-T binarios ejemplares de los tipos indicados en la Figura 2, se eliminó el casete de expresión GUS-intrón de pTHW136 por digestión con *XbaI* y *HindIII*, seguido del relleno de los salientes con la polimerasa Klenow y de la religación de los extremos romos resultantes. El vector obtenido mediante este método se denominó posteriormente p0130.

45 En una etapa posterior, el gen del marcador de selección *nptII* se eliminó de p0130 por digestión con *BamHI* y la religación posterior de los salientes compatibles del vector. Este procedimiento dio un vector de ADN-T binario denominado pCDVIB. El vector pCDVIB por lo tanto contiene una región en el LB de tipo octopina que se expande a una secuencia central flanqueada por una región externa marginal y por lo tanto es una construcción del tipo B como se indica en la Figura 2.

50 Para crear una construcción del tipo E indicada en la Figura 2, se diseñaron dos oligonucleótidos largos, prmCDVIB1 F y prmCDVIB1 R, con las siguientes secuencias:

-prmCDVIB1F:

55 5'(1) **CATGGAGCGGCGGCAGGATATATTCAATTGTAAATGGCTAGCGGCGGCAGGATATATTCAATTGTAAATGGCTG**(84)3' (SEC ID N° 5); sitio *NcoI* en negrita y con doble subrayado, secuencias centrales de margen izquierdo en cursiva y con un solo subrayado, residuo G del extremo 3' parte de un sitio *BamHI*; y

-prmCDVIB1R:

60 5(1') **GATCCAGCCATTACAATTGAATATATCCTGCCGCCGCTAGCCA-TTACAATTGAATATATCCTGCCGCCGCT**(84)3' (SEC ID N° 6); sitio *NcoI* en negrita y con doble subrayado, secuencias centrales de margen izquierdo en cursiva y con un solo subrayado, residuo C del extremo 3' parte de un sitio *BamHI*;

65 Los oligonucleótidos prmCDVIB1F y prmCDVIB1R son complementarios a lo largo de una distancia de 80 nucleótidos y dan, después de la hibridación, un fragmento de ADNds que tiene en su extremo 5' (en relación a prmCDVIB1F) un saliente 5' *NcoI* ("CATG") y en su extremo 3' (en relación a prmCDVIB1F) un saliente 5' *BamHI*

## ES 2 335 614 T3

(“GATC”). Dicho fragmento de ADNds además contiene un tándem de dos secuencias centrales del LB de tipo octopina correspondientes a los nucleótidos 12-33 y 46-67 de prmCOVIB1F. Ambas secuencias centrales del LB se extienden cadena arriba y cadena abajo mediante 6 pares de bases adicionales que se originan en el LB natural de pTi15955 y son idénticas a pTiAch5 (Gielen *et al.* 1984). Las repeticiones en el tándem de secuencias centrales del LB por lo tanto están separadas por 12 pb. Dicho fragmento de ADNds con las secuencias centrales del LB dispuestas en tándem se insertaron cadena arriba de y adyacentes a la secuencia central del LB de p0130 digerido con NcoI y BamHI, dando pCDVIB1. El pCDVIB1 por lo tanto contiene una región en el margen izquierdo de tipo octopina que se extiende a una región externa del LB y tres secuencias centrales del LB dispuestas en tándem.

10 Para crear una construcción del tipo A indicada en la Figura 2, se diseñaron dos oligonucleótidos largos, prmCDVIB2F y prmCDVtB2R, con las siguientes secuencias:

-prmCDVIB2F:

15 5'(1) **CATGGCCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGATGGTCAATATGGAGAAAAAGA**  
AAGAGTAATTACCAATTTTTTTTCAATTCAAAAATGTAGATGTCCG(116) 3' (SEC ID N° 7); sitio  
NcoI parcial en negrita y con doble subrayado, residuo G del extremo 3' parte de un sitio BamHI; y

-pCDVIB2R:

20 5'(1) **GATCCGGACATCTACATTTTTGAATTGAAAAAAATTGGTAATTACTCTTTCTTTTTCTCCA**  
TATTGACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGC(116)3' (SEQ ID N° 8); sitio BamHI  
parcial en negrita y con doble subrayado, residuo C del extremo 3' parte de un sitio NcoI;

25 Los oligonucleótidos prmCDVIB2F y prmCDVIB2R son complementarios a lo largo de una distancia de 112 nucleótidos y dan, después de la hibridación, un fragmento de ADNds que tiene en su extremo 5' (en relación a prmCDVIB1F) un saliente 5' NcoI (“CATG”) y en su extremo 3' (en relación a prmCDVIB1F) un saliente 5' BamHI (“GATC”). Dicho fragmento de ADNds además contiene una región interna de 112 pb de pTi15955. Este fragmento se insertó cadena arriba de y adyacente a la secuencia central del LB de p0130 digerido con NcoI y BamHI, dando pCDVIB2. pCDVIB2 por lo tanto contiene una región LB de tipo octopina que abarca una secuencia central de LB embebida en las regiones interna y externa del LB.

30 Se realizó otra construcción del vector de ADN-T con un LB modificado que combina características de las construcciones de tipo E y F indicadas en la Figura 2. Se obtuvo una región en el LB de tipo nopalina integral como un fragmento BclI-EcoRI de 331 pb del vector de ADN-T binario pZP200. Este fragmento se extiende a la región externa del LB de tipo nopalina, a la secuencia central del LB y a la región interna del LB que procede del pTiC58 (Gielen *et al.* 1999). Dicha región del LB de tipo nopalina se insertó cadena arriba y adyacente a la región del LB de tipo octopina de pCDVIB2 (que contiene secuencias centrales del LB de tipo octopina repetidas en tándem) digerido con BamHI (localizado en el extremo 3' del tándem de la secuencia central del LB, en relación a prmCOVIB2F) y EcoRI, dando pCDVIB3. El pCDVIB3 por lo tanto contiene una región del LB que se extiende a una copia de una región del LB de tipo octopina integral con tres secuencias centrales dispuestas en tándem y una copia de una región en el LB de tipo nopalina integral.

45 Todos los vectores de ADN-T ejemplares descritos con una región del LB modificada, es decir, pCDVIB, pCDVIB1, pCDVIB2 y pCDVIB3 sirven como punto de partida para insertar uno o más genes de interés y/o genes marcadores de selección entre el RB y el LB de dichos vectores de ADN-T.

50 El gen marcador de selección de neomicina fosfotransferasa (*nptII*) bajo el control del promotor de la nopalina sintasa (*nos*) (*Pnos-nptII-3'ocs*) y el casete de expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*) bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (*P35S-gus-3'nos*) se insertaron entre el RB y el LB de dichos vectores de ADN-T.

55 El casete *nptII-gus* procede del plásmido pXD610 (De Loose *et al.*, 1995) como un fragmento EcoRI-AgeI. Este fragmento se insertó en los sitios *SalI/EcoRI* de pCDVIB; pCDVIB1; pCDVIB2 y pCDVIB3. Para obtener extremos cohesivos compatibles, se usaron dos oligonucleótidos adaptadores entre los sitios abiertos AgeI y *SalI* con las siguientes secuencias:

\* Napod3:

60 **CCGGTGGCTCGAGG** (SEC ID N° 9); sitio AgeI parcial en negrita, residuo G de extremo 3' parte de un sitio *SalI*; y

\* Napod4:

65 **TGCACCTCGAGCCA** (SEC ID N° 10); sitio *SalI* parcial subrayado, residuo A de extremo 3' parte de un sitio AgeI.

Los oligonucleótidos Napod3 y Napod4 son complementarios a lo largo de una distancia de 8 nucleótidos y dan, después de la hibridación, un fragmento de ADNds que tiene en su extremo 5' (en relación a Napod3) un saliente

## ES 2 335 614 T3

5' AgeI ("CCGG") y en su extremo 3' (en relación a Napod3) un saliente *SaII* ("TCGA"). Los vectores obtenidos se denominaron pCDVIB+gusnpt, pCDVIB1+gusnpt, pCDVIB2+gusnpt y pCDVIB3+gusnpt.

### 5 Ejemplo 5

#### *Construcción de vectores de ADN-T optimizados con sitios de recombinación integrados*

Se construyeron como sigue vectores de ADN-T binarios optimizados ejemplares de los tipos indicados en la Figura 3. En este ejemplo, el vector de ADN-T binario optimizado procede del pCDVIB (véase el Ejemplo 4).

Una estrategia para introducir sitios de recombinación comprende:

1. Diseñar pares de cebadores para la amplificación por PCR de dominios del vector cadena arriba del RB y cadena abajo del LB. Dichos dominios tienen que incluir un único sitio de restricción cadena arriba del RB (por ejemplo, el sitio *NarI* en el replicón pVS1 contenido dentro del esqueleto del vector pCDVIB) y cadena abajo del LB (por ejemplo, el sitio *BclI* en el marcador de resistencia Sm/Sp contenido dentro del esqueleto del vector pCDVIB). Los cebadores de la PCR localizados en o cercanos al RB o al LB están diseñados de manera que contienen un único sitio de restricción en 5' seguido del sitio de recombinación (por ejemplo, el sitio FRT) en su orientación correcta (como repeticiones directas fuera de los márgenes del ADN-T en el caso de los sitios FRT) y seguido de parte de las regiones externas del margen. Los productos obtenidos de la PCR se digieren posteriormente con las enzimas apropiadas.
2. Diseñar pares de oligonucleótidos complementarios (similar al Ejemplo 4) dando después de la hibridación moléculas de ADNds que se extienden a la secuencia central del RB o del LB y con un saliente complementario al único sitio de restricción 5' de dichos cebadores en (1) localizados en o próximos a los márgenes y con un segundo saliente complementario a un único sitio de restricción cadena abajo de la secuencia central del RB (por ejemplo, *ScaI* en pCDVIB) o complementario a un único sitio de restricción cadena arriba de la secuencia central del LB (por ejemplo, *NcoI* en pCDVIB).
3.
  - (a) Digerir pCDVIB con *NarI* (en el replicón pVS) y *ScaI* (cadena abajo de la secuencia central del RB) seguido de una ligación trimolecular de 1) el vector resultante con 2) el producto digerido de la PCR que incluye el fragmento pCDVIB suprimido y la introducción de sitios de recombinación y 3) el ADNds basado en los oligonucleótidos hibridados y la reintroducción de la secuencia central del RB.
  - (b) Digerir el vector obtenido finalmente en (3a) con *BclI* (en el marcador de resistencia Sm/Sp) y *NcoI* (cadena arriba de la secuencia central del LB) seguido de una ligación trimolecular de 1) el vector resultante con 2) el producto digerido de la PCR que incluye el fragmento pCDVIB suprimido y la introducción de sitios de recombinación y 3) el ADNds basado en los oligonucleótidos hibridados y la reintroducción de la secuencia central del LB.

Los vectores de ADN-T ejemplares descritos con sitios de recombinación introducidos sirven como punto de partida para insertar uno o más genes de interés y/o uno o más genes marcadores de selección entre el RB y el LB de dicho vector de ADN-T.

### 50 Ejemplo 6

#### *Predicción de las frecuencias de transferencia del esqueleto del vector usando cultivos de Agrobacterium inducidos*

Se pueden inducir cepas de *Agrobacterium* que contienen cualquier vector de ADN-T para la producción de cadenas de ADN-Tss añadiendo acetosiringona a una concentración de 100  $\mu$ M al medio de cultivo (Durrenberger *et al.* 1989). La producción de cadenas de ADN-Tss se puede analizar usando uno de los siguientes métodos (véanse los incluidos en la figura para una visión esquemática).

1. Se aísla el ADN total de las células de *Agrobacterium* que contienen un vector de ADN-T dado. Los duplicados de transferencias de Southern no desnaturalizantes (Tinland *et al.* 1995) de 5  $\mu$ g aproximadamente de este ADN aislado de las diferentes cepas de *Agrobacterium* se hibridan a dos sondas diferentes: una que reconoce una secuencia de ADN que es parte del ADN-T y otra que reconoce una secuencia de ADN que es parte del esqueleto del vector que flanquea el margen izquierdo. La señal de hibridación de la sonda que reconoce las secuencias del esqueleto del vector está ausente o muy reducida en el caso de un vector de ADN-T a partir del cual se procesa el margen izquierdo con una eficacia elevada. No obstante, la señal de hibridación de la sonda que reconoce el ADN-T es constante.

2. Se aísla el ADN total de las células de *Agrobacterium* que contienen un vector de ADN-T dado. Se preparan dos digestiones separadas que contienen cantidades iguales del ADN total, una con una enzima de restricción que corta el ADN-T en o muy próximo al margen izquierdo, la otra con una enzima de restricción que corta dentro de la secuencia de ADN-T. No obstante, las cadenas de ADN-Tss permanecerán intactas. Se usan pares de cebadores específicos en una PCR cuantitativa para amplificar una secuencia procedente del ADN-T y una secuencia procedente del vector cadena abajo del margen izquierdo. De nuevo, se obtiene mucho menos o ningún producto de amplificación del esqueleto del vector en el caso de un vector de ADN-T a partir del cual se procesa el margen izquierdo con una eficacia elevada. No obstante, las cantidades del producto de la amplificación específica del ADN-T son constantes.

Para ambos tipos de análisis, se clona un casete de expresión de GFP (proteína verde fluorescente) adicional inmediatamente cadena abajo del margen izquierdo de los diferentes vectores de ADN-T. Este casete proporciona una secuencia "esqueleto del vector" completamente conocida cadena abajo del margen izquierdo. El casete de expresión de GUS se usa como diana específica del ADN-T. Ambos casetes de expresión contienen un intrón en las regiones codificantes de GFP y GUS, respectivamente, para prevenir la expresión de ambos marcadores en *Agrobacterium*.

En la Figura 6 se representan esquemáticamente los dos montajes experimentales. Por encima de la línea negra continua que indica el vector de ADN-T, se muestra la estrategia de la hibridación y por debajo de la línea continua, se muestra la estrategia de la PCR cuantitativa.

### Ejemplo 7

#### *Análisis tempranos de secuencias de transferencia del esqueleto del vector a células de la planta*

Se usan las construcciones apuntadas en el Ejemplo 6 y que contienen un casete de expresión de GFP adicional cadena abajo del margen izquierdo en un ensayo de expresión transitorio para la valoración de la transferencia del esqueleto del vector a células de la planta. Con este propósito, fragmentos radiculares de *Arabidopsis* se transforman con *Agrobacterium* (De Buck *et al.* 1999, Valvekens *et al.* 1988) que contiene un vector de ADN-T descrito anteriormente. Después de tres días de cultivo conjunto, las raíces se valoran primero con respecto a la expresión transitoria de la GFP por valoración de la proteína GUS expresada transitoriamente. El nivel de expresión de GFP es bajo o cero en el caso de un vector de ADN-T a partir del cual se procesa el margen izquierdo con una eficacia elevada. No obstante, los niveles de actividades de la GUS son constantes.

Como alternativa, el método de transcripción inversa seguido de la PCR se continúa por la detección y cuantificación de los niveles de transcritos de GFP y GUS acumulados transitoriamente (Narasimhulu *et al.* 1996). De nuevo, se obtiene mucho menos o ningún producto de amplificación específica de la GFP en el caso de un vector de ADN-T a partir del cual se procesa el margen izquierdo con una eficacia elevada. No obstante, las cantidades del producto de la amplificación específica de la GUS son constantes.

### Ejemplo 8

#### *Curación de plantas transformadas de secuencias del esqueleto del vector integradas*

Se transforman plantas (por ejemplo, *Arabidopsis*) (véase el Ejemplo 1) con el vector de ADN-T ejemplar del Ejemplo 5 que contiene los sitios de recombinación FRT. Las plantas regeneradas se ensayan con respecto a la integración del esqueleto del vector según cualquiera de los métodos descritos en los Ejemplos 2-3 ó 6-7 y se seleccionan las plantas transgénicas que contienen el ADN-T y el esqueleto del vector en su genoma.

En la floración, un grupo de plantas transgénicas seleccionadas se somete a polinización cruzada con polen procedente de otra planta transgénica que expresa constitutivamente la recombinasa específica del sitio de FLP mientras que un segundo grupo de plantas transgénicas seleccionadas se somete a polinización cruzada con polen procedente de una planta natural. Se recogen las semillas y se siembran en medio que contiene un agente selectivo. Las plantas supervivientes (debido al marcador de selección en el ADN-T) de ambos cruces se analizan de nuevo con respecto a la presencia de ADN-T y con respecto a la presencia del esqueleto del vector. En una parte sustancial de la progenie de los cruces que implican al progenitor que expresa la FLP y que contienen el ADN-T, se eliminan las secuencias del esqueleto del vector. En la progenie de los cruces que implican al progenitor del de tipo silvestre y que contienen el ADN-T, aún están presentes las secuencias del esqueleto del vector.

### Ejemplo 9

#### *Clonación del locus *virD* e influencia de una copia extra del locus sobre la transferencia del esqueleto del vector*

Se conocen las secuencias de los loci *virD* de tipo octopina y de tipo nopalina (Yanofsky *et al.* 1986, Jayaswal *et al.* 1987; y Wang *et al.* 1990, respectivamente). Se diseñan cebadores específicos que permiten la amplificación por PCR de los loci *virD* completos. Estos loci se subclonan posteriormente en un plásmido que lleva el replicón P15a

## ES 2 335 614 T3

(Chang y Cohen 1987) y un marcador de resistencia a tetraciclina procedente de pAlter (Promega). Los plásmidos se movilizan posteriormente a *Agrobacterium* que contiene un vector de ADN-T. La transferencia de las secuencias del esqueleto del vector mediante dichas cepas de *Agrobacterium* se analiza de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 2, 3, 5 ó 6.

5

Ejemplo 10

*Determinación de la frecuencia de iniciación de la transferencia en el margen izquierdo*

10

Se transforman plantas con los vectores de ADN-T descritos en la Figura 2. Se prepara el ADN total y se sintetizan tres grupos de cebadores para llevar a cabo diferentes reacciones de PCR. El primer grupo de cebadores amplifica un fragmento de ADN-T interno, adyacente a la repetición marginal izquierda (fragmento de PCR 1). El segundo grupo de cebadores amplifica un fragmento de ADN-T/vector que se extiende a la región del margen izquierdo del ADN-T y la región del vector adyacente a la repetición marginal izquierda (fragmento de PCR 2). Finalmente, el tercer grupo de cebadores amplifica un fragmento del vector adyacente a la repetición del margen izquierdo (fragmento de PCR 3). Dependiendo de si la transferencia del vector da como resultado la ultralectura en el margen izquierdo o la iniciación en el margen izquierdo, se amplifican diferentes fragmentos por PCR. Cuando sólo está presente el fragmento de PCR 1, la transferencia del ADN-T se inicia en el margen derecho y se detiene en el margen izquierdo y no se transfiere ADN del vector. Cuando están presentes los fragmentos de PCR 1, 2 y 3, la transferencia del ADN-T se inicia en el margen derecho pero no se detiene en el margen izquierdo. Cuando están presentes los fragmentos de PCR 1 y 3, pero no el fragmento 2, la transferencia del vector se inicia en el margen izquierdo, independientemente de la transferencia del ADN-T en el margen derecho. De esta manera, realizando estas diferentes reacciones de PCR para 50 transformantes aproximadamente, se obtiene la frecuencia de ultralectura en el margen izquierdo y la frecuencia de iniciación en la repetición marginal izquierda. La frecuencia de ultralectura y la iniciación de la transferencia del vector se determinan para diferentes vectores de ADN-T con la repetición marginal izquierdo en contextos diferentes.

25

30

TABLA 1

*Presencia (+) o ausencia (-) de secuencias del vector unidas a LB y RB del ADN-T en plantas de A. thaliana transgénicas co-transformadas con vectores de ADN-T K y Hsb*

35

Número de co-transformantes	LB100	LB1000	RB100	RB1000	LB100	LB1000	RB100	RB1000	PicA	Unl <sup>p</sup>
Serie 1 (18 plantas)	R				Hsb					
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(R)
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+(R)
3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+(R)
1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-	+	+	-	nt <sup>c</sup>
1	+	+	-	-	+	-	+	-	-	nt
2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	nt
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	nt
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	nt
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	nt
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	nt

<sup>a</sup> Indica el número de transformantes con un patrón particular de secuencias del vector presentes en las plantas transformadas.  
<sup>b</sup> Los fragmentos de repetición del margen externo derecho (R) o izquierdo (L) están presentes en cualquiera de los vectores de ADN-T, no unidos a cualquiera de los márgenes.  
<sup>c</sup> No ensayado.

55

60

65

# ES 2 335 614 T3

TABLA 2

*Presencia (+) o ausencia (-) de secuencias del vector unidas al LB y al RB del ADN-T en plantas de N. tabacum transgénicas transformadas con el vector de ADN-T Ksb*

5

10

15

20

Número de co-transformantes	LB100	LB1000	RB100	RB1000	PicA	Un <sup>b</sup>
<b>Serie 2 (36 plantas)</b>	<b>Ksb</b>					
17	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	+(R)
3	+	+	-	-	-	-
1	-	-	+	+	-	-
1	+	-	+	-	-	nt <sup>c</sup>
1	+	+	+	-	-	nt
8	+	+	+	+	-	nt

<sup>a</sup> Indica el número de transformantes con un patrón particular de secuencias del vector presentes en las plantas transformadas.  
<sup>b</sup> Los fragmentos de repetición del margen externo derecho (R) o izquierdo (L) están presentes en cualquiera de los vectores de ADN-T, no unidos a cualquiera de los márgenes.  
<sup>c</sup> No ensayado.

25

## Bibliografía

EP0332104 **Montoya, A., Duesing, J., Harms, C., Meins, F., Payne, G., Ryals, J. and Sperisen, C. 1989.** Chemically regulatable DNA sequences and genes and uses thereof.

30

EP0823480 **Gaelweiler, L., Palme, K., Grosskopf-Kroiler, D., Schell, J. and Moore, I. 1998.** Controlled gene expression in plants.

US5527695 **Hodges T.K. and Lyznik L. 1996.** Controlled modification of eukaryotic genomes.

35

US5801027 **Ramsay, N., Bennett, M. and May, S. 1998.** Method of using transactivation proteins to control gene expression in transgenic plants.

WO90/08826 **Bright, S.W.J., Greenland, A.J., Schuch, W.W. and Bridges, I.G. 1990.** Gene switch.

40

WO97/12046 **Hansen, G. and Chilton, M.-D. 1997.** Improved integration of exogenous DNA delivered to eukaryotic cells.

WO97/30164 **Haseloff, J.P. and Hodge, S. 1997.** Improvements in or relating to gene expression.

45

WO98/45455 **Beijersbergen, A.G., de Groot, M.J.A., Gouka, R.J., Hooykaas, P.J. and Bundock, P. 1998.** Agrobacterium-mediated transformation of moulds, in particular those belonging to the genus *Aspergillus*.

WO98/59062 **Liu, Z.-B. and Odell, J.T. 1998.** Specific gene activation by chimeric GAL4 transcription factors in stable transgenic plants.

50

WO99/01563 **Stuiver, M.H., Ponstein, A.S., Ohl, S.A., Goddijn, O.J.M., Simons, L.H., Dekker, B.M.M., Hoekstra, S. and Tigelaar, H. 1999.** Plasmids for plant transformation and method for using the same.

55

WO99/14348 **Lefebvre, D., Ko, K., Ko, Z. and Tremblay, L. 1999.** In planta transformation of plants.

WO99/23202 **Ow, D., and Srivastava, V. 1999.** Resolution of complex integration patterns to obtain single copy transgenes.

60

WO99/25821 **Baszczynski, C.L., Bowen, B.A., Peterson, D.J. and Tagliani, L.A. 1999.** Compositions and methods for genetic modification of plants.

WO99/25840 **Baszczynski C.L., Lyznik L., Gordon-Kamm W.J., Rao A.G., Tagliani, L.A. and Guan, X. 1999.** A novel method for the integration of foreign DNA into eukaryotic genomes.

65

**Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas, P.J. 1995.** Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 3206-3214.

- Caplan, A.B., Van Montagu, M. and Schell, J. 1985.** Genetic analysis of integration mediated by single T-DNA borders. *J Bacteriol* 161, 655-664.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. 1987.** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134: 1141-1156.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
- Cluster, P.D., O'Dell, M., Metzloff, M. and Flavell, R.B. 1996.** Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol Biol* 32: 1197-1203.
- Dale, E.C. and Ow, D.W. 1990.** Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* 91: 79-85.
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A. 1998.** *Agrobacterium tumefaciens* transformation and cotransformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 449-457.
- De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A. 1999.** The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* (in press)
- Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J. and Beijersbergen, A.G. 1998.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 16: 839-842.
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker A. 1997.** T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs. *Plant J* 11: 15-29.
- Deng, W., Chen, L., Peng, W.T., Liang, X., Sekiguchi, S., Gordon, M.P., Comai, L. and Nester, E.W. 1999.** VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 31: 1795-1807.
- Durrenberger, F., Cramer, A., Hohn, B. and Koukolikova-Nicola, Z. 1989.** Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9154-9158.
- Errampali, D., Patton, D., Castle, L., Mickelson, K., Hansen, K., Schnall, J., Feldmann, K. and Meinke, D. 1991.** Embryogenic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 149-157.
- Fedoroff, N.V. and Smith, D.L. 1993.** A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant J* 3: 273-289.
- Feldmann, K.A. 1991.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: a mutational spectrum. *Plant J* 1:71-82.
- Gelvin, S.B. 1998a.** The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol* 9: 227-232.
- Gelvin, S.B. 1998b.** *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol* 180: 4300-4302.
- Ghai, J. and Das, A. 1989.** The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3109-3113.
- Gheysen, G., Angenon, G. and Van Montagu, M. 1998.** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. In K. Lindsey (Ed.), *Transgenic Plant Research*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 1-33.
- Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeckl, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. 1984.** The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J* 3: 835-846.
- Gielen, J., Terryn, N., Villaroel, R. and Van Montagu, M. 1999.** Complete nucleotide sequence of the T-DNA region of the plant tumour-inducing *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J Exper Bot* 50: 1421-1422.
- Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T. and de Groot, M.J. 1999.** Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnol* 17, 598-601.
- Guralnick, B., Thomsen, G. and Citovsky, V. 1996.** Transport of DNA into the nuclei of *Xenopus* oocytes by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium*. *Plant Cell* 8: 363-373.

## ES 2 335 614 T3

- Hansen, G. and Chilton, M.-D.** 1996. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14978-14983.
- Hansen, G., Shilito, R.D. and Chilton, M.-D.** 1997. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11726-11730.
- Hanson, B., Engler, D., Moy, Y., Newman, B., Ralston, E. and Gutterson, N.** 1999. A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J* 19: 727-734.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Horsch, R.B. and Klee, H.J.** 1986. Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: role of T-DNA borders in the transfer process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4428-4432.
- Iglesias, V.A., Moscone, E.A., Papp, I., Neuhuber, F., Michalowski, S., Phelan, T., Spiker, S. Matzke, M. and Matzke, A.J.M.** 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 9: 1251-1264.
- Jayaswal, R.K., Veluthambi, K., Gelvin, S.B. and Slightom, J.L.** 1987. Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a virD-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 169: 5035-5045.
- Jakowitsch, J., Papp, I., Moscone, E.A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J.M.** 1999. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J* 17: 131-140.
- Jen, G.C. and Chilton, M.D.** 1986a. Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by mini-T plasmids. *J Bacteriol* 166: 491-499.
- Jen, G.C. and Chilton, M.D.** 1986b. The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3895-3899.
- Jones, J. D. G., Dunsmuir, P., and Bedbrook, J.** (1985). High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.* 4, 2411-2418.
- Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G.P. and Schell, J.** 1992. T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol* 20: 963-976.
- Kononov, M.E., Bassuner, B. and Gelvin, S.B.** 1997. Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J* 11: 945-957.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harb or. **Martineau, B., Voelker, T.A. and Sanders, R.A.** 1994. On defining T-DNA. *Plant Cell* 6: 1032-1033 (Letter to the editor).
- Matzke, A.J.M. and Matzke, M.A.** 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* 1: 142-148.
- Mysore, K.S., Bassuner, B., Deng, X.B., Darbinian, N.S., Motchoulski, A., Ream, W. and Gelvin, S.B.** 1998. Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 668-683.
- Narasimhulu, S.B., Deng, X.B., Sarria, R. and Gelvin, S.B.** 1996. Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell* 8: 873-886.
- Onouchi, H., Nishihama, R., Kudo, M., Machida, Y., and Machida, C.** (1995). Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 247, 653-660.
- Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., and Machida, Y.** (1991). Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 6373-6378.
- Ooms, G., Bakker, A., Molendijk, L., Wullems, G.J., Gordon, M.P., Nester, E.W. and Schilperoort, R.A.** 1982. T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell* 30: 589-597.

- Osborne, B.I., Wirtz, U. and Baker, B. 1995.** A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J* 7: 687-701.
- Pansegrau, W. and Lanka, E. 1996.** Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. *J Biol Chem* 271: 13068-13076.
- Peralta, E.G., Hellmiss, R. and Ream, W. 1986.** Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J* 5, 1137-1142.
- Ramanathan, V. and Veluthambi, K. 1995.** Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol Biol* 28: 1149-1154.
- Relic, B., Andjelkovic, M., Rossi, L., Nagamine, Y. and Hohn, B. 1998.** Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9105-9110.
- Rossi, L., Hohn, B. and Tinland, B. 1993.** The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plant. *Mol Gen Genet* 239: 345-353.
- Rossi, L., Hohn, B. and Tinland, B. 1996.** Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 126-130.
- Schlappi, M., Smith, D. and Fedoroff, N. 1993.** TnpA trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. *Genetics* 133: 1009-1021.
- Shaw, C.H., Watson, M.D., Carter, G.H. and Shaw, C.H. 1984.** The right hand copy of the nopaline Ti-plasmid 25 bp repeat is required for tumour formation. *Nucleic Acids Res* 12: 6031-6041.
- Shurvinton, C.E., Hodges, L., Ream, W. 1992.** A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11837-11841.
- Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E., and Ebinuma, H. (2000).** Technical advance: A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [In Process Citation]. *Plant J.* 22, 461-469.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A.M. and Hohn, B. 1995.** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J* 14: 3585-3595.
- Valvekens, D., Van Montagu, D. and Van Lijsebettens, M. 1988.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536-5540.
- Van der Graaff, E., den Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P.J.J. 1996.** Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol Biol* 31: 677-681.
- Van Haaren, M.J.J., Sedee, N.J.A., Schilperoort, R.A. and Hooykaas, P.J.J. 1987.** Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucl Acids Res* 15: 8983-8997.
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaegen, R., and Van Montagu, M. 1991.** Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theor Appl Genet* 81: 277-284.
- Van Sluys, M.A., Tempe, J. and Fedoroff, N. 1987.** Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J* 6: 3881-3889.
- Virts, E.L. and Gelvin, S.B. 1985.** Analysis of transfer of tumor-inducing plasmids from *Agrobacterium tumefaciens* to *Petunia protoplasts*. *J. Bacteriol* 162: 1030-1038.
- Wang, K., Genetello, C., Van Montagu, M. and Zambryski, P.C. 1987.** Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol Gen Genet* 210: 338-346.
- Wang, K., Herrera-Estrella, A. and Van Montagu, M. 1990.** Overexpression of virD1 and virD2 genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation. *J Bacteriol* 172: 4432-4440.
- Waters, V.L. and Guiney, D.G. 1993.** Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol* 9: 1123-1130.

## ES 2 335 614 T3

Wenck, A., Czakó, M., Kanevski, I. and Márton, L. 1997. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediate transformation. *Plant Mol Biol* 34: 913-922.

Wolters, A.-M.A., Trindade, L.M., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F. 1998. Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *Plant J* 13: 837-847.

Yanofsky, M.F., Porter, S.G., Young, C., Albright, L.M., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1986. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47: 471-477.

Young, C. and Nester, E.W. 1988. Association of the *virD2* protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170: 3367-3374.

Yusibov, V.M., Steck, T.R., Gupta, V. and Gelvin, S.B. 1994. Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2994-2998.

Ziemienowicz, A., Gorlich, D., Lanka, E., Hohn, B., and Rossi, L. (1999). Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 3729-3733.

Zupan, J.R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol* 107: 1041-1047.

### Referencias citada en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9845455 A [0003][0104][0151]
- WO 9901563 A [0010][0062][0063][0079][0097]
- [0151]
- EP 0604662 A [0056]
- EP 0687730 A [0056]
- WO 9712046 A [0060][0090][0151]
- WO 9925840 A [0068][0151]
- US 5527695 A [0068][0151]
- WO 9925821 A [0068][0151]
- WO 9923202 A [0068][0151]
- US 5801027 A [0087][0151]
- WO 9730164 A [0087][0151]
- WO 9589062 A [0087][0151]
- EP 0823480 A [0087][0151]
- EP 0332104 A [0088][0151]
- WO 9008826 A [0088][0151]
- WO 9914348 A [0104][0151]
- EP 1989 A [0151]
- EP 1998 A [0151]
- US 1996 A [0151]
- US 1998 A [0151]
- WO 1997 A [0151]
- WO 1998 A [0151]
- WO 1999 A [0151]
- EP 99870265 A [0152]
- US 60195758 B [0152]

### Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- Hellens *et al.* *Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 42, 819-832, <http://www.pgreen.ac.uk> [0053]
- Bundock, P.; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A.; Hooykaas, P.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1995, vol. 14, 3206-3214 [0151]
- Caplan, A.B.; Van Montagu, M.; Schell, J. Genetic analysis of integration mediated by single T-DNA borders. *J Bacteriol*, 1985, vol. 161, 655-664 [0151]

## ES 2 335 614 T3

- **Chang, A.C.; Cohen, S.N.** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol*, 1987, vol. 134, 1141-1156 [0151]
- **Clough, S.J.; Bent, A.F.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, vol. 16, 735-743 [0151]
- **Cluster, P.D.; O'Dell, M.; Metzlaff, M.; Flavell, R.B.** Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol Biol*, 1996, vol. 32, 1197-1203 [0151]
- **Dale, E.C.; Ow, D.W.** Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*, 1990, vol. 91, 79-85 [0151]
- **De Buck, S.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A.** *Agrobacterium tumefaciens* transformation and co-transformation frequencies of *Arabidopsis thaliana* root explants and tobacco protoplasts. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, vol. 11, 449-457 [0151]
- **De Buck, S.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A.** The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J*, 1999 [0151]
- **De Groot, M.J.; Bundock, P.; Hooykaas, P.J.; Beijersbergen, A.G.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 1998, vol. 16, 839-842 [0151]
- **De Neve, M.; De Buck, S.; Jacobs, A.; Van Montagu, M.; Depicker, A.** T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs. *Plant J*, 1997, vol. 11, 15-29 [0151]
- **Deng, W.; Chen, L.; Peng, W.T.; Liang, X.; Sekiguchi, S.; Gordon, M.P.; Comai, L.; Nester, E.W.** VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol*, 1999, vol. 31, 1795-1807 [0151]
- **Durrenberger, F.; Cramer, A.; Hohn, B.; Koukolikova-Nicola, Z.** Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 9154-9158 [0151]
- **Errampali, D.; Patton, D.; Castle, L.; Mickelson, K.; Hansen, K.; Schnell, J.; Feldmann, K.; Meinke, D.** Embryogenic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 149-157 [0151]
- **Fedoroff, N.V.; Smith, D.L.** A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 1993, vol. 3, 273-289 [0151]
- **Feldmann, K.A.** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: a mutational spectrum. *Plant J*, 1991, vol. 1, 71-82 [0151]
- **Gelvin, S.B.** The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, vol. 9, 227-232 [0151]
- **Gelvin, S.B.** *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *J Bacteriol*, 1998, vol. 180, 4300-4302 [0151]
- **Ghai, J.; Das, A.** The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, 3109-3113 [0151]
- **Agrobacterium-mediated plant transformation: a scientifically intriguing story with significant applications. Gheysen, G.; Angenon, G.; Van Montagu, M.** *Transgenic Plant Research*. Harwood Academic Publishers, 1998, 1-33 [0151]
- **Gielen, J.; De Beuckeleer, M.; Seurinck, J.; Deboeckl, F.; De Greve, H.; Lemmers, M.; Van Montagu, M.; Schell, J.** The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J*, 1984, vol. 3, 835-846 [0151]
- **Gielen, J.; Terryn, N.; Villaroel, R.; Van Montagu, M.** Complete nucleotide sequence of the T-DNA region of the plant tumour-inducing *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J Exper Bot*, 1999, vol. 50, 1421-1422 [0151]
- **Gouka, R.J.; Gerk, C.; Hooykaas, P.J.; Bundock, P.; Musters, W.; Verrips, C.T.; de Groot, M.J.** Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnol*, 1999, vol. 17, 598-601 [0151]

## ES 2 335 614 T3

- **Guralnick, B.; Thomsen, G.; Citovsky, V.** Transposon of DNA into the nuclei of *Xenopus oocytes* by a modified VirE2 protein of *Agrobacterium*. *Plant Cell*, vol. 8, 363-373 [0151]
- 5 • **Hansen, G.; Chilton, M.-D.** “Agroclistic” transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 14978-14983 [0151]
- **Hansen, G.; Shilito, R.D.; Chilton, M.-D.** T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 11726-11730 [0151]
- 10 • **Hanson, B.; Engler, D.; Moy, Y.; Newman, B.; Ralston, E.; Gutterson, N.** A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J*, 1999, vol. 19, 727-734 [0151]
- **Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffmann, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, vol. 227, 1229-1231 [0151]
- 15 • **Horsch, R.B.; Klee, H.J.** Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: role of T-DNA borders in the transfer process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 4428-4432 [0151]
- 20 • **Iglesias, V.A.; Moscone, E.A.; Papp, I.; Neuhuber, F.; Michalowski, S.; Phelan, T.; Spiker, S.; Matzke, M.; Matzke, A.J.M.** Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell*, 1997, vol. 9, 1251-1264 [0151]
- **Jayaswal, R.K.; Veluthambi, K.; Gelvin, S.B.; Slightom, J.L.** Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a virD-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1987, vol. 169, 5035-5045 [0151]
- 25 • **Jakowitsch, J.; Papp, I.; Moscone, E.A.; van der Winden, J.; Matzke, M.; Matzke, A.J.M.** Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J*, 1999, vol. 17, 131-140 [0151]
- 30 • **Jen, G.C.; Chilton, M.D.** Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by mini-T plasmids. *J Bacteriol*, 1986, vol. 166, 491-499 [0151]
- 35 • **Jen, G.C.; Chilton, M.D.** The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 3895-3899 [0151]
- **Jones, J. D. G.; Dunsmuir, P.; Bedbrook, J.** High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2411-2418 [0151]
- 40 • **Koncz, C.; Nemeth, K.; Redei, G.P.; Schell, J.** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 20, 963-976 [0151]
- **Kononov, M.E.; Bassuner, B.; Gelvin, S.B.** Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J*, 1997, vol. 11, 945-957 [0151]
- 45 • **Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.** Molecular Cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982 [0151]
- 50 • On defining T-DNA. **Martineau, B.; Voelker, T.A.; Sanders, R.A.** *Plant Cell*. 1994, vol. 6, 1032-1033 [0151]
- **Matzke, A.J.M.; Matzke, M.A.** Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, vol. 1, 142-148 [0151]
- 55 • **Mysore, K.S.; Bassuner, B.; Deng, X.B.; Darbinian, N.S.; Motchoulski, A.; Ream, W.; Gelvin, S.B.** Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, vol. 11, 668-683 [0151]
- **Narasimhulu, S.B.; Deng, X.B.; Sarria, R.; Gelvin, S.B.** Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, 873-886 [0151]
- 60 • **Onouchi, H.; Nishihama, R.; Kudo, M.; Machida, Y.; Machida, C.** Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 247, 653-660 [0151]
- 65 • **Onouchi, H.; Yokoi, K.; Machida, C.; Matsuzaki, H.; Oshima, Y.; Matsuoka, K.; Nakamura, K.; Machida, Y.** Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res*, 1991, vol. 19, 6373-6378 [0151]

- **Ooms, G.; Bakker, A.; Moiendijk, L.; Wullems, G.J.; Gordon, M.P.; Nester, E.W.; Schilperoort, R.A.** T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell*, 1982, vol. 30, 589-597 [0151]
- 5 • **Osborne, B.I.; Wirtz, U.; Baker, B.** A system for insertional mutagenesis and chromosomal rearrangement using the Ds transposon and Cre-lox. *Plant J*, 1995, vol. 7, 687-701 [0151]
- **Pansegrau, W.; Lanka, E.** Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, 13068-13076 [0151]
- 10 • **Peralta, E.G.; Hellmiss, R.; Ream, W. Overdrive**, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J*, 1986, vol. 5, 1137-1142 [0151]
- **Ramanathan, V.; Veluthambi, K.** Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol Biol*, 1995, vol. 28, 1149-1154 [0151]
- 15 • **Relic, B.; Andjelkovic, M.; Rossi, L.; Nagamine, Y.; Hohn, B.** Interaction of the DNA modifying proteins VirD1 and VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens*: analysis by subcellular localization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 9105-9110 [0151]
- 20 • **Rossi, L.; Hohn, B.; Tinland, B.** The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signáis important for transfer of T-DNA to plant. *Mol Gen Genet*, 1993, vol. 239, 345-353 [0151]
- **Rossi, L.; Hohn, B.; Tinland, B.** Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 126-130 [0151]
- 25 • **Schlappi, M.; Smith, D.; Fedoroff, N.** TnpA trans-activates methylated maize Suppressor-mutator transposable elements in transgenic tobacco. *Genetics*, 1993, vol. 133, 1009-1021 [0151]
- **Shaw, C.H.; Watson, M.D.; Carter, G.H.; Shaw, C.H.** The right hand copy of the nopaline Ti-plasmid 25 bp repeat is required fortumourformation. *Nucleic Acids Res*, 1984, vol. 12, 6031-6041 [0151]
- 30 • **Shurvinton, C.E.; Hodges, L.; Ream, W.** A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 11837-11841 [0151]
- 35 • **Sugita, K.; Kasahara, T.; Matsunaga, E.; Ebinuma, H.** Technical advance: A transformation vector for the production of marker- free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [In Process Citation]. *Plant J*, 2000, vol. 22, 461-469 [0151]
- 40 • **Tinland, B.; Schoumacher, F.; Gloeckler, V.; Bravo-Angel, A.M.; Hohn, B.** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J*, 1995, vol. 14, 3585-3595 [0151]
- 45 • **Valvekens, D.; Van Montagu, D.; Van Lijsebettens, M.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 5536-5540 [0151]
- **Van der Graaff, E.; den Dulk-Ras, A.; Hooykaas, P.J.J.** Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol Biol*, 1996, vol. 31, 677-681 [0151]
- 50 • **Van Haaren, M.J.J.; Sedee, N.J.A.; Schilperoort, R.A.; Hooykaas, P.J.J.** Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucl Acids Res*, 1987, vol. 15, 8983-8997 [0151]
- 55 • **Van Lijsebettens, M.; Vanderhaegen, R.; Van Montagu, M.** Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theor Appl Genet*, 1991, vol. 81, 277-284 [0151]
- **Van Sluys, M.A.; Tempe, J.; Fedoroff, N.** Studies on the introduction and mobility of the maize Activator element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J*, 1987, vol. 6, 3881-3889 [0151]
- 60 • **Virts, E.L.; Gelvin, S.B.** Analysis of transfer of tumor-inducing plasmids from *Agrobacterium tumefaciens* to *Petunia* protoplasts. *J. Bacteriol*, 1985, vol. 162, 1030-1038 [0151]
- 65 • **Wang, K.; Genetello, C.; Van Montagu, M.; Zambryski, P.C.** Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol Gen Genet*, 1987, vol. 210, 338-346 [0151]

## ES 2 335 614 T3

- **Wang, K.; Herrera-Estrella, A.; Van Montagu, M.** Overexpression of virD1 and virD2 genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation. *J Bacteriol*, 1990, vol. 172, 4432-4440 [0151]
- 5 • **Waters, V.L.; Guiney, D.G.** Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol*, 1993, vol. 9, 1123-1130 [0151]
- **Wenck, A.; Czakó, M.; Kanevski, I.; Márton, L.** Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediate transformation. *Plant Mol Biol*, 1997, vol. 34, 913-922 [0151]
- 10 • **Wolters, A.-M.A.; Trindade, L.M.; Jacobsen, E.; Visser, R.G.F.** Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *Plant J*, 1998, vol. 13, 837-847 [0151]
- **Yanofsky, M.F.; Porter, S.G.; Young, C.; Albright, L.M.; Gordon, M.P.; Nester, E.W.** The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell*, 1986, vol. 47, 471-477 [0151]
- 15 • **Young, C.; Nester, E.W.** Association of the virD2 protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1988, vol. 170, 3367-3374 [0151]
- **Yusibov, V.M.; Steck, T.R.; Gupta, V.; Gelvin, S.B.** Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, 2994-2998 [0151]
- 20 • **Ziemienowicz, A.; Gorlich, D.; Lanka, E.; Hohn, B.; Rossi, L.** Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, 3729-3733 [0151]
- 25 • **Zupan, J.R.; Zambryski, P.** Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*, 1995, vol. 107, 1041-1047 [0151]

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Vector de transformación de ADN-T que comprende ADN-T con márgenes de ADN-T flanqueantes a izquierda y derecha modificados, **caracterizado** porque el margen derecho de ADN-T modificado consiste en una región externa de margen derecho, una secuencia central del margen derecho y una región interna de margen derecho, y el margen izquierdo de ADN-T modificado consiste en

10 (i) una repetición de los márgenes izquierdos del ADN-T en la que dicha repetición comprende al menos un margen izquierdo de ADN-T de tipo nopalina y al menos un margen izquierdo de ADN-T de tipo octopina, **caracterizado** adicionalmente porque dicho margen izquierdo de ADN-T modificado comprende al menos una secuencia central del margen izquierdo, o

15 (ii) una sola secuencia central de margen izquierdo, una región externa de margen izquierdo y una región proximal de margen izquierdo de la región interna con una longitud preferible de 10 a 100 pb, **caracterizada** adicionalmente porque dicha región proximal de margen izquierdo de la región interna está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT del 60 al 85%.

20 2. Vector para la transformación mediada por *Agrobacterium*, para la transformación agrolística o para fines de terapia génica con márgenes de ADN-T modificados como se ha definido en la reivindicación 1, en el que dicho vector se escoge entre vectores de transformación binarios, vectores de transformación superbinarios, vectores de transformación co-integrados, vectores de transformación derivados de Ri y vectores portadores de ADN-T usados en transformación agrolística o terapia génica.

25 3. Procedimiento para la obtención de plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos transgénicos que consiste en una transformación mediada por *Agrobacterium* de dichas plantas, levaduras, mohos u hongos filamentosos con un vector de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

30 4. Procedimiento para prevenir la integración de secuencias del esqueleto del vector en una célula transformada mediante *Agrobacterium*, que comprende el uso de un vector de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2.

5. Procedimiento de la reivindicación 4 que comprende adicionalmente aumentar la producción de las proteínas VirD1 y/o VirD2 comprendidas dentro del complejo de corte de ADN-T.

35 6. Procedimiento de la reivindicación 5 que implica la integración de al menos una copia adicional del locus virD en el genoma o en una entidad extracromosómica de *Agrobacterium*.

40 7. Procedimiento de la reivindicación 6 en el que dicha copia adicional del locus virD se selecciona entre el locus virD de tipo octopina y el locus virD de tipo nopalina.

8. Procedimiento de transformación agrolística de una célula eucariota usando un vector de ADN-T de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

45 9. Célula hospedadora recombinante que contiene un vector según se define en las reivindicaciones 1 ó 2.

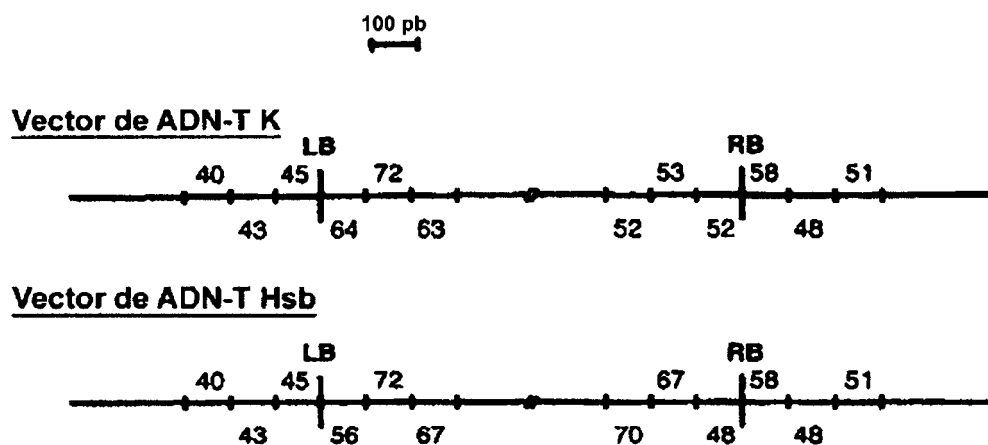
10. Célula hospedadora de la reivindicación 9 identificada como *Agrobacterium tumefaciens*.

50 11. Célula de planta o una planta transgénica, una parte transgénica de la misma o su descendencia transgénica, que comprende un ADN-T procedente del vector de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho ADN-T comprende una región proximal de margen izquierdo de la región interna con una longitud preferible de 10 a 100 pb, **caracterizada** adicionalmente porque dicha región proximal del margen izquierdo de la región interna está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT del 60 al 85%.

55 12. Levadura, moho u hongo filamentosos transgénico que comprende un ADN-T procedente del vector de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho ADN-T comprende una región proximal del margen izquierdo de la región interna con una longitud preferible de 10 a 100 pb, **caracterizada** adicionalmente porque dicha región proximal del margen izquierdo de la región interna está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT del 60 al 85%.

60 13. ADN-T procedente del vector de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicho ADN-T comprende una región proximal del margen izquierdo de la región interna con una longitud preferible de 10 a 100 pb, **caracterizado** adicionalmente porque dicha región proximal del margen izquierdo de la región interna está enriquecida en el número de residuos de A y T, siendo el porcentaje de residuos AT del 60 al 85%.

65



**Sitios de las regiones interna y externa del LB y el RB (todos de pTiAch5, Gielen et al., 1984) en vectores de ADN-T K y Hsb:**

Vector de ADN-T K: Región interna del LB: 689 pb  
 Región externa del LB: 306 pb  
 Región interna del RB: 251 pb  
 Región externa del RB: 146 pb

Vector de ADN-T Hsb: Región interna del LB: ~30 pb  
 Región externa del LB: 306 pb  
 Región interna del RB: 49 pb  
 Región externa del RB: 146 pb

**FIGURA 1**

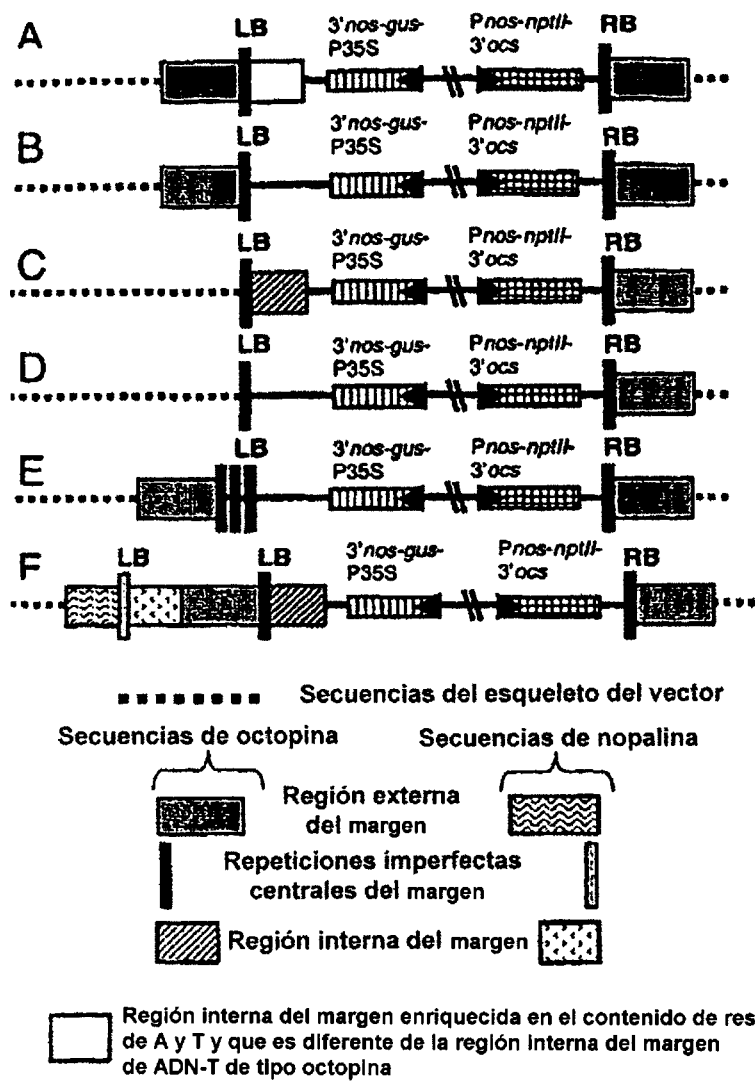


FIGURA 2

← : Sitio de recombinación  
 LB: margen izquierdo  
 RB: margen derecho

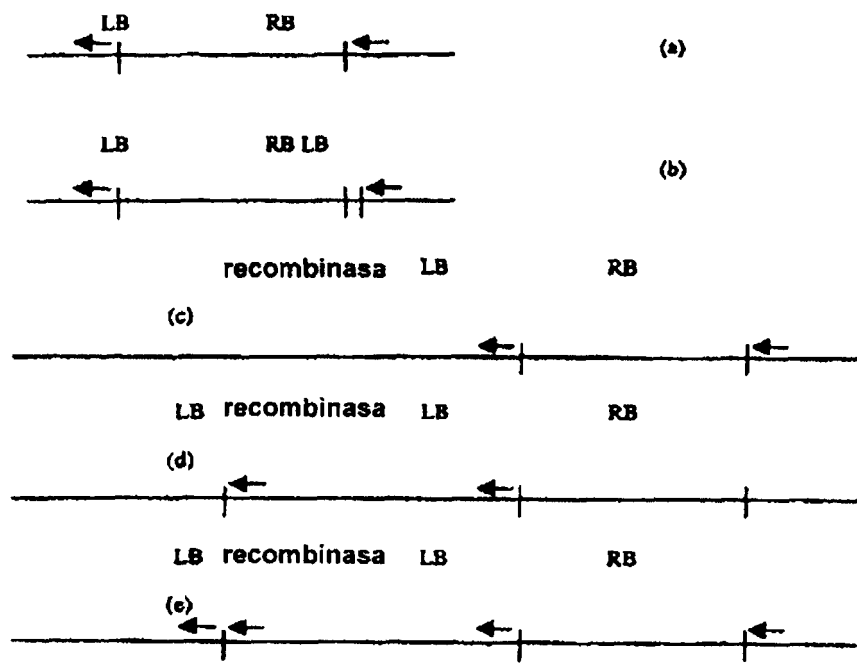


FIGURA 3

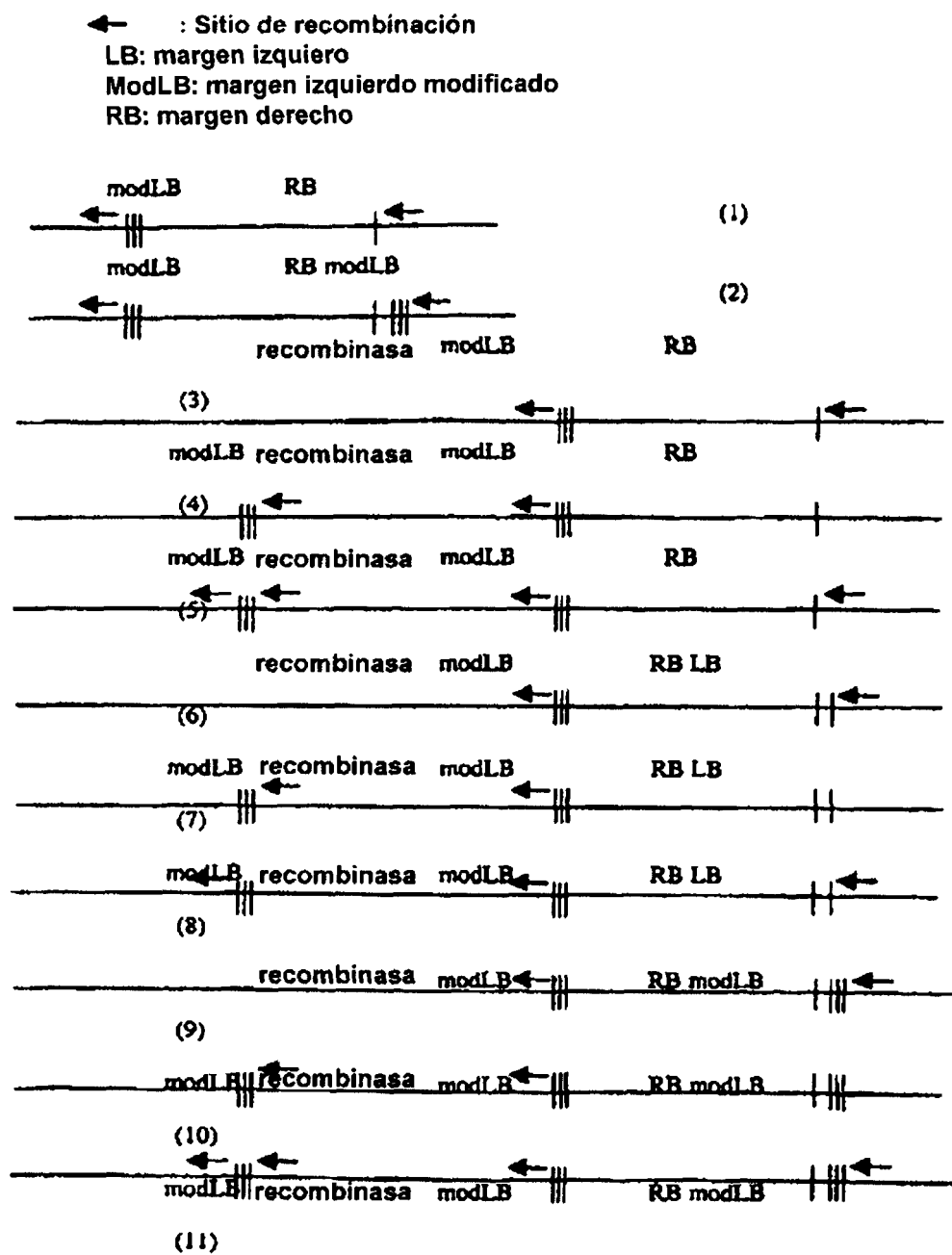


FIGURA 4

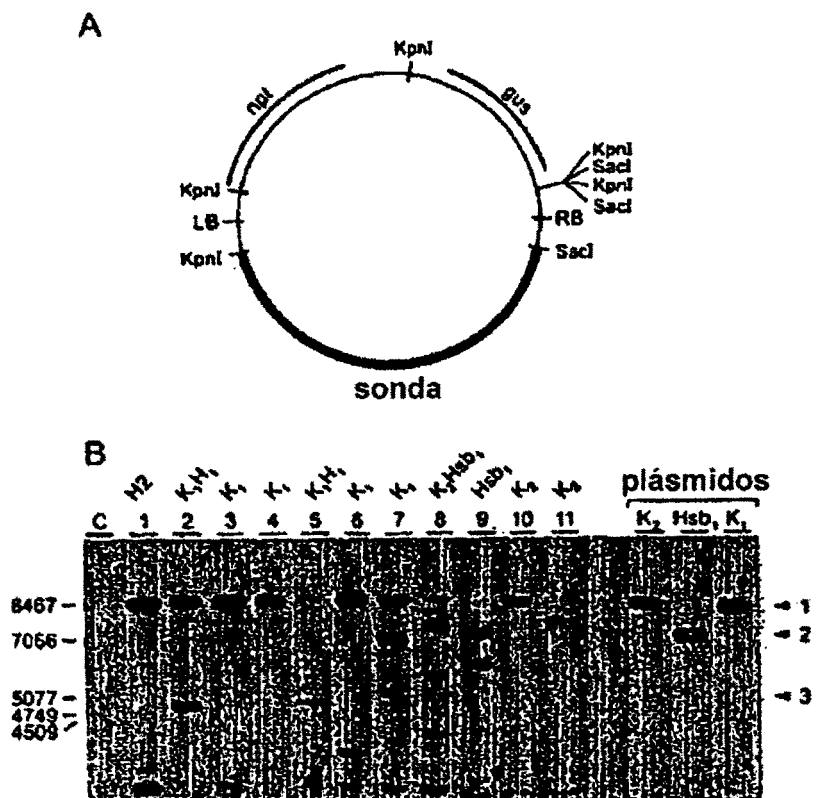


FIGURA 5

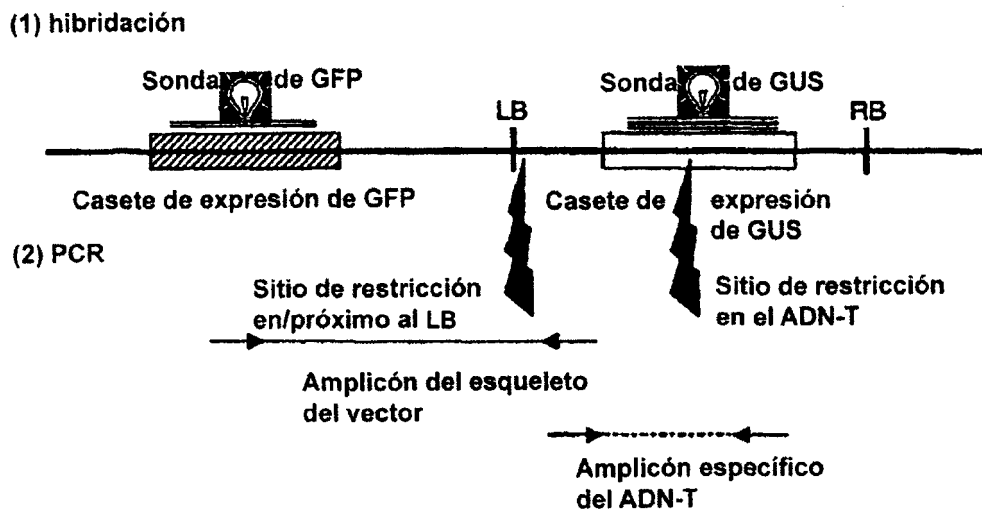


FIGURA 6

# ES 2 335 614 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CropDesign N.V.
- 5 <120> Transferencia optimizada de ADN-T y sus vectores
- <130> CROP-002-EP-DIV
- 10 <150> EP 99870264.1  
<151> 16-12-1999
- <150> US 60/195.758  
15 <151> 10-04-2000
- <160> 10
- 20 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 44  
25 <212> ADN  
<213> *Agrobacterium tumefaciens*
- <400> 1  
30  
tgatgctgac tggcaggata tataccgtg taattgagc tcgt 44
- <210> 2  
35 <211> 44  
<212> ADN  
<213> *Agrobacterium tumefaciens*
- <400> 2  
40  
gcggcagcgg cggcaggata tattcaattg taaatggctt catg 44
- <210> 3  
45 <211> 44  
<212> ADN  
50 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
- <400> 3  
55  
tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaa 44
- <210> 4  
<211> 44  
60 <212> ADN  
<213> *Agrobacterium tumefaciens*
- <400> 4  
65  
ggctggctgg tggcaggata tattgtgtg taaacaaatt gacg 44



# ES 2 335 614 T3

<400> 8

5                    **gatccggaca tctacat ttt tgaattgaaa aaaaattggt aattactctt tctttttctc    60**  
                  **catattgacc atcatactca ttgctgatcc atgtagattt cccggc                    106**

<210> 9

10 <211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 9

20

                  ccggtggctc gagg

14

<210> 10

25 <211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 10

35

                  tcgacctega gcca

14

40

45

50

55

60

65