



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 895**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03795830 .3**

96 Fecha de presentación : **20.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1563079**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Método para controlar procesos celulares en plantas.**

30 Prioridad: **20.11.2002 DE 102 54 166**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2010

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

72 Inventor/es: **Werner, Stefan;**
Marillonnet, Sylvestre;
Klimyuk, Victor y
Gleba, Yuri

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Método para controlar procesos celulares en plantas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para controlar un proceso celular de interés en una planta mediante una señal externa como un polipéptido aplicado externamente. El proceso de la invención permite el control selectivo de la expresión transgénica en una planta modificada genéticamente de forma transitoria o estable, por lo que un proceso celular de interés no funcional previamente en la planta se puede activar selectivamente en cualquier momento determinado.

Antecedentes de la invención15 *Sistemas de expresión transgénica controlables en plantas*

Uno de los problemas principales en la biotecnología de plantas es la consecución de control fiable sobre la expresión transgénica. El control estricto sobre la expresión génica en plantas es esencial si un producto cadena abajo de expresión transgénica es inhibidor del cultivo o tóxico, como por ejemplo, plásticos biodegradables (Nawrath, Poirier & Somerville, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 12760-12764; John & Keller, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., 93 12768-12773; los documentos US6103956 y US5650555) o toxinas proteicas (el documento US6140075). Las tecnologías existentes para controlar la expresión génica en plantas, habitualmente se basan en promotores específicos de tejido e inducibles y prácticamente todos ellos sufren de una actividad basal de expresión incluso cuando no se han inducido, es decir, los mismos son "filtrantes". Los promotores específicos de tejido (documentos US05955361 y WO09828431) representan una herramienta potente pero su uso está limitado a áreas muy específicas de aplicaciones, por ejemplo, para producir plantas estériles (documento WO09839462) o expresar genes de interés en semillas (documentos WO00068388 y US05608152). Los promotores inducibles se pueden dividir en dos categorías de acuerdo con sus condiciones de inducción: aquellos inducidos por factores abióticos (temperatura, luz y sustancias químicas) y aquellos que se pueden inducir mediante factores bióticos, por ejemplo, ataque por patógeno o plaga. Los ejemplos de la primera categoría son promotores inducibles por calor (documento US 05187287) e inducibles por frío (documento US05847102), un sistema inducible por cobre (Mett *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 4567-4571), sistemas inducibles por esteroides (Aoyama & Chua, 1997, Plant J., 11, 605-612; McNellis *et al.*, 1998, Plant J., 14, 247-257; documento US06063985), un sistema inducible por etanol (Caddick *et al.*, 1997, Nature Biotech., 16, 177-180; documento WO09321334) y un sistema inducible por tetraciclina (Weinmann *et al.*, 1994, Plant J., 5 559-569). Uno de los últimos desarrollos en el área de sistemas químicamente inducibles para plantas es un promotor quimérico que se puede activar mediante el glucocorticoide dexametasona e inactivarse mediante tetraciclina (Bohner *et al.*, 1999, Plant J., 19, 87-95). Para una revisión sobre sistemas químicamente inducibles véase: Zuo & Chua, (2000, Current Opin. Biotechnol., 11, 146-151). Otros ejemplos de promotores inducibles son los promotores que controlan la expresión de genes relacionados con patogénesis (PR) en plantas. Estos promotores se pueden inducir mediante tratamiento de una planta con ácido salicílico, un componente importante de las rutas de señalización de plantas en respuesta a ataques por patógeno u otros compuestos químicos (benzo-1,2,3-tiadiazol o ácido isonicotínico) que son capaces de desencadenar la expresión del gen par (documento US05942662).

Existen informes de sistemas de expresión transgénica controlables que usan ARN viral/ARN polimerasa proporcionados por infección viral (por ejemplo, véanse los documentos US6093554 y US5919705). En estos sistemas, una secuencia de ADN de planta recombinante incluye las secuencias de nucleótidos del genoma viral reconocidas por ARN viral/ARN polimerasa. La eficacia de estos sistemas es limitada debido a la capacidad baja de polimerasas virales de proporcionar funciones en trans y su incapacidad de controlar procesos diferentes a la amplificación de ARN. Otra manera es desencadenar un proceso de interés en una planta transgénica usando un virus genéticamente modificado que proporcione un ácido nucleico heterólogo que codifique un interruptor para un proceso bioquímico en una planta modificada genéticamente (documento WO02068664).

Los sistemas descritos anteriormente son de interés significativo como oportunidades para obtener patrones deseados de expresión transgénica, pero los mismos no permiten el control estricto sobre los patrones de expresión, ya que los agentes inductores (cobre) o sus análogos (brassinosteroides en el caso de sistemas controlables por esteroides) pueden estar presentes en tejidos vegetales en niveles suficientes para provocar expresión residual. Adicionalmente, el uso de antibióticos y esteroides como inductores químicos no es deseable o económicamente inviable para aplicaciones a gran escala. Cuando se usan promotores de genes PR o ARN viral/ARN polimerasas como medios de control para transgenes, la necesidad de control estricto sobre la expresión transgénica tampoco se satisface, ya que la infección por patógeno casual o el estrés pueden provocar la expresión. Los promotores específicos de tejido o de órgano están limitados a áreas muy limitadas de aplicación, ya que los mismos confinan la expresión a un órgano específico o fase del desarrollo de la planta, pero no permiten que el transgen se active a voluntad. Los interruptores virales recombinantes como se han descrito en el documento WO02/068664 se dirigen a todos estos problemas, pero no garantizan los requerimientos de seguridad ambiental estrictos, ya que el ácido nucleico heterólogo en el vector viral se puede recombinar.

Existe bibliografía abundante que incluye solicitudes de patentes que describen el diseño de plantas resistentes a virus mediante la expresión de genes virales o formas mutadas de ARN viral (por ejemplo, los documentos US5792926

y US6040496). Sin embargo, existe un riesgo ambiental asociado con el uso de tales plantas debido a la posibilidad de formar virus novedosos mediante recombinación entre el virus de estimulación y el ARN o ADN viral transgénico (Adair & Kearney, 2000, Arch. Virol, 145. 1867-1883).

Hooykaas y sus colegas (2000, Science, 290, 979-982; documento WO01/89283), han descrito el uso de una fusión traduccional de recombinasa Cre con fragmentos de gen *vir* para translocación de recombinasa mediada por *Agrobacterium* en células vegetales. Los acontecimientos de recombinación *in planta* mediada por Cre dio como resultado un fenotipo seleccionable. La translocación de recombinasa Cre es el primer uso de una proteína translocada como un interruptor para desencadenar un proceso de interés en células vegetales. Sin embargo, a pesar de que la translocación no está acompañada necesariamente por transferencia de ADN, este enfoque no garantiza un nivel de seguridad elevado, ya que el microorganismo fitopatógeno genéticamente modificado (*Agrobacterium*) posee una secuencia codificante completa de la proteína interruptora de recombinasa Cre. Además, el proceso de interés sólo se puede desencadenar en células que reciben la proteína interruptora. Si se tienen que tratar grandes conjuntos celulares, la proporción de células que recibe la proteína interruptora al número total de células se vuelve muy pequeña. Por lo tanto, el método de Hooykaas no se puede aplicar a plantas enteras. En lugar de ello, su utilidad está limitada a células en cultivo de tejido o cultivo celular.

Por lo tanto, es un objeto proporcionar un método para activar un proceso celular de interés en plantas enteras. Es otro objeto de la invención proporcionar un método seguro para el entorno para activar un proceso celular de interés en plantas, mediante el cual el proceso celular se puede activar selectivamente en cualquier momento predeterminado. Es otro objeto proporcionar un método para producir un producto en una planta transgénica, en el que la producción del producto se puede activar selectivamente después de que la planta ha crecido hasta una fase deseada, por lo que el proceso es seguro con respecto al entorno en el sentido de que el material genético necesario para dicho proceso celular y el material genético que codifica la función de control no se propagan en el entorno juntos.

Descripción general de la invención

Los objetos anteriores se consiguen mediante un método para controlar una planta modificada genéticamente, como se ha definido en la reivindicación 1 y 2.

También se describen plantas modificadas genéticamente o partes de las mismas obtenidas o que se pueden obtener mediante el método de la invención. Las partes de dichas plantas pueden ser hojas y semillas. Las semillas son los ejemplos más preferidos de partes de una planta.

También se describe una planta modificada genéticamente que contiene un ácido nucleico heterólogo en células de la misma, donde dicha planta es inactiva con respecto a un proceso celular de interés,

donde dicho ácido nucleico heterólogo está adaptado de forma de que dicho proceso celular de interés se pueda activar introduciendo directamente un polipéptido en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo, donde dicho polipéptido y dicho ácido nucleico heterólogo están adaptados mutuamente de forma que dicho polipéptido sea capaz de activar dicho proceso celular de interés.

Adicionalmente se describe un sistema para controlar un proceso celular de interés en una planta modificada genéticamente, que comprende una planta como se ha definido anteriormente y un polipéptido para activar dicho proceso celular de interés en la planta modificada genéticamente, mediante el cual dicha planta y dicho polipéptido están adaptados mutuamente de forma que dicho polipéptido sea capaz de activar dicho proceso celular de interés.

La presente invención permite activar un proceso celular de interés en una planta introduciendo directamente un polipéptido en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo. La introducción directa de dicho polipéptido se refiere a que dicha introducción no comprende aplicar ácidos nucleicos a dicha planta que codifiquen dicho polipéptido o una parte funcional de dicho polipéptido. Una parte de dicho polipéptido es funcional si es capaz de activar el proceso celular de la invención. Mediante dicha aplicación directa de dicho polipéptido a dicha planta, se consigue un nivel muy elevado de seguridad biológica mediante la invención, ya que la planta no se pone en contacto con material genético que podría activar dicho proceso celular de interés. En lugar de ello, se proporciona al menos un componente necesario para dicho proceso celular a la planta como un polipéptido sin material genético que codifique dicho polipéptido. Una ventaja principal de la invención es que el material genético necesario para el proceso celular de interés y el material genético que codifica dicho polipéptido no se pueden transferir ambos a progenie de dicha planta o, de otra manera, propagarse juntos en el entorno.

El método de Hooykaas (2000, Science, 290, 979-982; documento WO01/89283) permite activar un proceso celular de interés en células vegetales, mediante el cual una proteína interruptora se introduce usando bacterias patógenas. Como este método está limitado a cultivo celular (a escala de laboratorio), no surgen preocupaciones con respecto a la seguridad biológica debido al uso de *Agrobacterias* que codifiquen la proteína interruptora. La presente invención proporciona por primera vez un método para controlar un proceso celular de interés que es eficaz en plantas enteras y que es al mismo tiempo seguro con respecto al entorno incluso cuando se usa a gran escala como en un invernadero o en un campo agrícola.

En la etapa (a) de la reivindicación 1 ó 2 se proporciona una planta modificada genéticamente. Son preferidas las plantas superiores, concretamente plantas de cultivo superiores. Dicha planta está modificada genéticamente en el sentido de que las células de dicha planta contienen un ácido nucleico heterólogo que está implicado en la activación de dichos procesos celulares de interés. En muchos casos, dicho ácido nucleico heterólogo puede codificar una proteína que se tiene que expresar. Dicha planta proporcionada en la etapa (a) puede ser una planta transgénica, por lo que la mayoría o todas las células de dicha planta contienen dicho ácido nucleico heterólogo integrado de forma estable en el genoma de dichas células. Dicho ácido nucleico heterólogo se puede integrar de forma estable en el genoma nuclear o en el genoma de organelas tales como mitocondrias o, preferiblemente, plástidos. La integración de dicho ácido nucleico heterólogo en el genoma de plástido es provechosa con respecto a la seguridad biológica. El método de la reivindicación 1 ó 2 preferiblemente se realiza con plantas transgénicas. Sin embargo, como alternativa, dicha planta se puede modificar de forma transitoria y/o dicho ácido nucleico heterólogo puede estar presente en una fracción de células pero no en otras células. Un ácido nucleico heterólogo en una planta modificada de forma transitoria se puede integrar de forma estable en el genoma de dicha fracción de células o puede estar presente de forma episomal. La incorporación de dicho ácido nucleico heterólogo en una fracción de células de dicha planta se puede conseguir transfectando de forma transitoria dicho organismo, por ejemplo, usando transfección viral o transformación mediada por *Agrobacterium*. En cualquier caso, la planta modificada genéticamente proporcionada en la etapa (a) es inactiva con respecto al proceso celular de interés antes de que se haya realizado la etapa (b).

En la etapa (b) de la reivindicación 1 ó 2 de la invención, dicho polipéptido se introduce desde una composición sin células en al menos algunas de dichas células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo. Si dicha planta es transgénica, dicho polipéptido puede, en principio, aplicarse a cualquier parte o a cualquier célula de la planta. Si sólo una fracción de las células de dicha planta contienen dicho ácido nucleico heterólogo, dicho polipéptido se aplica a la planta de forma de que dicho polipéptido pueda alcanzar las células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo para activar el proceso celular de interés. Como se ha indicado anteriormente, dicho polipéptido se introduce directamente en células de dicha planta a partir de una composición sin células. Una composición sin células no contiene células viables que pudieran replicar ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido. Preferiblemente, dicha composición sin células no contiene células viables. Una composición sin células puede ser un extracto celular obtenido lisando células (por ejemplo, células como células bacterianas usadas para expresar dicho polipéptido), con la condición de que no existan células viables en dicha composición que pudieran replicar los ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido. Otros ejemplos de composiciones sin células son soluciones, preferiblemente soluciones acuosas tamponadas, de dicho polipéptido o dicho polipéptido en forma sólida o seca, con la condición de que no haya células viables como se ha definido anteriormente.

La introducción directa se puede realizar mediante (i) bombardeo de partículas (microproyectiles), (ii) aplicación de dicho polipéptido en al menos una parte de dicha planta o (iii) inyectando una solución que contiene dicho polipéptido en el tejido de dicha planta. En los métodos (ii) y (iii), dicho polipéptido está contenido típicamente en una composición líquida, preferiblemente acuosa, sin células (o solución) que se aplica a partes de la planta. Una composición de este tipo se puede aplicar, por ejemplo, pulverizando dicha planta con dicha composición que contiene dicho polipéptido. Además, dicha composición se puede inyectar de acuerdo con (iii).

Dicho polipéptido comprende una secuencia de translocación de membrana (MTS) que posibilita la entrada de dicho polipéptido en las células de dicha planta. Dicha secuencia de translocación de membrana está unida covalentemente a dicho polipéptido. Dicha secuencia de translocación de membrana puede ser un péptido que dota a dicho polipéptido con la capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células de dicho organismo. En la técnica se conocen muchas secuencias de translocación de membrana de este tipo. Frecuentemente, las mismas comprenden varios aminoácidos básicos, concretamente argininas. El tamaño de las secuencias de translocación de membrana puede variar ampliamente, sin embargo, las mismas típicamente tienen de 3 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 5 a 60 aminoácidos. Dicho polipéptido se puede producir mediante técnicas de expresión de proteína convencionales, por ejemplo, en *E. coli*. Preferiblemente se realiza la purificación de dicho polipéptido después de su expresión, concretamente la remoción o destrucción de ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido. Los ácidos nucleicos se pueden retirar o destruir mediante hidrólisis, preferiblemente catalizada por una enzima similar a (ADNasa) o una ribonucleasa (ARNasa). Además o adicionalmente, se pueden usar técnicas cromatográficas para retirar ácidos nucleicos de dicho polipéptido. Dicho polipéptido se puede aplicar a una planta, por ejemplo pulverizando dicha planta con una composición líquida, preferiblemente en una solución acuosa, que contiene dicho polipéptido. Preferiblemente, se toman medidas para facilitar la entrada de dicho polipéptido en las células de la planta, concretamente medidas que permitan atravesar la pared celular vegetal y/o la capa exterior de la planta. Un ejemplo de tales medidas es realizar lesiones ligeras en partes de la superficie de la planta, por ejemplo, mediante raspado mecánico. Otro ejemplo es el uso de enzimas de degradación de celulosa para debilitar o perforar la pared celular vegetal.

La activación del proceso celular de interés (etapa (b)) requiere introducir directamente dicho polipéptido desde una composición sin células en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo. Dicho polipéptido y dicho ácido nucleico heterólogo están adaptados mutuamente de forma que dicho polipéptido sea capaz de activar dicho proceso celular de interés.

Dicho proceso celular de interés comprende la formación de un amplicón de ARN expresable a partir de dicho ácido nucleico heterólogo.

Dicho polipéptido tiene un segmento que tiene una actividad enzimática de una recombinasa específica de sitio. Además, dicha activación de dicho proceso celular de interés puede comprender la formación de una proteína a partir de dicho ácido nucleico heterólogo o implicar dicho ácido nucleico heterólogo.

5 Una parte de la secuencia de dicho ácido nucleico heterólogo (o de dicho ácido nucleico adicional descrito más adelante) se puede unir operativamente a un promotor de transcripción mediante la acción de dicha proteína, que permite activar la expresión de una proteína de interés o la transcripción de un amplicón de ARN viral a partir de dicho ácido nucleico heterólogo adicional, por ejemplo, uniendo operativamente una secuencia que codifica dicha proteína de interés o un amplicón de ARN con un promotor. Una opción es separar, en dicho ácido nucleico heterólogo
10 (adicional), la secuencia que codifica un amplicón de ARN y un promotor mediante un bloque de secuencia que impide una unión operativa entre los mismos. Dicho bloque de secuencia se puede flanquear por sitios de recombinación de forma que dicho bloque se pueda cortar mediante una recombinasa que reconozca dichos sitios de recombinación. De ese modo, se puede establecer la unión operativa para la transcripción de la secuencia de codifica un amplicón de ARN y se puede activar la expresión. Otra opción es tener una parte de una secuencia necesaria para la transcripción
15 (por ejemplo, un promotor o parte de un promotor) en orientación invertida y flanqueada por sitios de recombinación. Proporcionar una recombinasa adecuada (por ejemplo, con dicho polipéptido) puede invertir dicha parte de secuencia de nuevo a su orientación correcta, mediante lo cual se puede establecer una unión operativa.

En la invención, el proceso celular es la formación de un amplicón expresable a partir de dicho ácido nucleico heterólogo. Dicho amplicón es capaz de amplificación dentro de las células de su activación o formación (vector de amplificación). Dicho amplicón puede ser un amplicón expresable que contenga un gen de interés que se tiene que expresar en dicho proceso celular de interés. Además, dicho amplicón puede ser con capacidad de movimiento de célula a célula o sistémico en la planta de la invención. El amplicón puede estar basado en un virus de ARN. Los virus de ARN vegetales, tales como tobamovirus, son preferidos. Las propiedades de amplificación de dicha proteína capaz
25 de propagarse (véase más adelante) y dicho amplicón se pueden comportar de forma sinérgica, permitiendo de ese modo un proceso celular extremadamente marcado de interés que se propaga a través de partes significativas de dicha planta (por ejemplo, conduciendo a expresión extremadamente marcada de una proteína de interés a partir de dicho amplicón). La modificación genética de amplicones basada en Tobamovirus se conoce la técnica (véase, por ejemplo, Dawson *et al.*, 1989, *Virology*, 172, 285-293; Yusibov *et al.*, 1999, *Cunt. Top. Microbiol. Immunol.*, 240 81-94; para una revisión, véase "Genetic Engineering With Plant Viruses", 1992, eds. Wilson y Davies, CRC Press, Inc.).
30

En una realización principal de la invención, dicha activación de dicho proceso celular de interés implica la formación de una proteína a partir de dicho ácido nucleico heterólogo, mediante lo cual dicha proteína es capaz de propagarse dentro de la planta, es decir, es capaz de dejar una célula de su formación y entrar en otras células de dicha planta (una proteína de este tipo también se denomina "proteína interruptora" en este documento). En otras células, dicha proteína puede activar un proceso celular de interés, concretamente controlando un ácido nucleico heterólogo adicional (véase más adelante). Dicha partida desde una célula y entrada en otras células preferiblemente comprende movimientos de célula a célula o movimiento sistémico en dicha planta o en una parte de la misma. Dicha proteína (también denominada en este documento "proteína interruptora") preferiblemente contiene una parte de proteína que
40 posibilita dicha partida de una célula y entrada en otras células de dicha proteína interruptora. Dicha parte de proteína puede ser un dominio de una proteína de movimiento viral o una proteína de cubierta viral. Además, dicha parte de proteína puede ser un factor de transcripción vegetal o animal o un dominio de un factor de transcripción vegetal o animal con capacidad de movimiento de célula a célula o sistémico. Además, dicha parte de proteína puede ser un mensajero intercelular peptídico vegetal o animal o un dominio mensajero intercelular peptídico vegetal o animal.
45 Además, dicha parte de proteína puede ser un péptido artificial capaz de posibilitar el movimiento de célula a célula o sistémico. Sin embargo, preferiblemente, dicha parte de proteína es o comprende una proteína de movimiento viral o proteína de cubierta viral o un dominio de un movimiento o proteína de cubierta viral.

Cuando dicha proteína capaz de propagarse entra en otras células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo, la misma preferiblemente es capaz de activar (inducir) la expresión de dicha proteína a partir de dicho ácido nucleico heterólogo. Mediante el aprovechamiento de esta proteína (proteína interruptora), el método de la invención permite amplificar y propagar la señal interruptora proporcionada externamente con dicho polipéptido en dicha planta. Particularmente, si el número de células inicialmente alcanzado por dicho polipéptido es pequeño, la señal interruptora se lleva eficazmente a células adicionales en dicha planta. Existen muchas formas en las que se puede hacer que dicha proteína controle su propia expresión a partir de dicho ácido nucleico heterólogo. Estas formas corresponden a
55 aquellas que se pueden emplear para dicho polipéptido de la etapa (b) proporcionado anteriormente.

Aparte de la capacidad controlar su propia expresión, la proteína preferiblemente tiene la capacidad de activar un proceso celular de interés. Aunque la activación de un proceso celular es preferida, es evidente para los expertos en la materia que el resultado final de un proceso celular que se ha activado también puede ser una supresión o una inactivación de un proceso en células de la planta. Para ser capaz de activar dicho proceso celular de interés, dicha proteína puede tener un segmento que sea capaz de controlar dicho proceso celular. Dicho segmento puede tener una actividad de unión o una actividad enzimática que controla un ácido nucleico (concretamente, dicho ácido nucleico heterólogo adicional) necesaria para dicho proceso celular de interés. En el método de la invención, dicha activación
65 de dicho proceso celular se puede conseguir análogamente al control de su propia expresión a partir de dicho ácido nucleico heterólogo. Para este propósito, dicha proteína puede tener un segmento para controlar dicho proceso celular y un segmento para provocar dicha expresión de dicha proteína, por lo que los mecanismos de control de dichos dos segmentos pueden ser diferentes. Preferiblemente, los dos mecanismos de control son similares o idénticos, en los que

un segmento de dicha proteína puede ser suficiente para activar dicho proceso celular y para controlar la expresión de dicha proteína. Por tanto, con fines de simplicidad, dicha proteína contiene más preferiblemente dicho un segmento y una parte que dota a dicha proteína de la capacidad de partir de una célula y entrar en otras células de dicha planta.

En la invención, dicho polipéptido de la invención puede tener la misma función interruptora que dicha proteína interruptora, por ejemplo, tener las mismas actividades enzimáticas que dicha proteína interruptora. Dicho polipéptido se aplica externamente y puede activar un proceso celular de interés en células en las que entra. Dicha proteína interruptora se produce dentro de las células de dicha planta modificada genéticamente, preferiblemente como respuesta a la función interruptora de dicho polipéptido. Dicha proteína interruptora puede, a su vez, después de su producción en las células de dicha planta, activar un proceso celular de interés en células en las que se produce y/o en otras células de dicha planta. Si dicho polipéptido y dicha proteína interruptora ejercen su función interruptora mediante la misma o una actividad enzimática relacionada, los mismos pueden diferir en que dicho polipéptido tiene una secuencia de translocación de membrana, mientras que dicha proteína interruptora preferiblemente tiene una parte de proteína que dota a dicha proteína interruptora de la capacidad de partir de una célula y entrar en otras células.

Dicho proceso celular de interés puede necesitar, como se ha mencionado anteriormente, la presencia de un ácido nucleico heterólogo adicional en células de dicha planta en las que dicho proceso celular se tiene que controlar. Dicho ácido nucleico heterólogo adicional puede estar presente en todas las células o en una fracción de células de dicha planta. El mismo se puede incorporar de forma estable en genomas nucleares o de organelas de células de dicho organismo. Lo que se ha mencionado con respecto a dicho ácido nucleico heterólogo de la invención generalmente se aplica también a dicho ácido nucleico heterólogo adicional. Preferiblemente, dicha planta es transgénica con respecto a dicho ácido nucleico heterólogo adicional y respecto a dicho ácido nucleico heterólogo.

Se hará uso de dicho ácido nucleico heterólogo adicional si, por ejemplo, dicho ácido nucleico heterólogo se usa para formar una proteína capaz de propagarse en la planta. La proteína de propagación después puede activar un proceso celular de interés codificado en dicho ácido nucleico heterólogo adicional. La Fig. 8 ilustra una realización de este tipo. El proceso celular de interés que se puede activar a partir de dicho ácido nucleico heterólogo adicional corresponde a los que se han mencionado con relación a dicho ácido nucleico heterólogo.

Una proteína expresada a partir de dicho ácido nucleico heterólogo y dicho polipéptido introducido directamente pueden generar en conjunto una función predeterminada que conduce a la activación de dicho proceso celular de interés sólo cuando dicha proteína y dicho polipéptido están presentes en conjunto (consúltese la Fig. 3). Preferiblemente, dicha proteína y dicho polipéptido generan en conjunto dicha función predeterminada mediante corte y empalme *trans* mediado por inteína o mediante interacción de afinidad mediada por inteína. Dicha función predeterminada después puede activar el proceso celular de la invención. Dicha función predeterminada puede ser, por ejemplo, una actividad de unión o una actividad enzimática que puede actuar sobre dicho ácido nucleico heterólogo adicional de forma similar a la que se ha descrito anteriormente para dicha proteína.

El proceso celular de interés que se ha activado como se ha descrito en este documento, sin embargo, no tiene que afectar a la planta completa. En lugar de ello, dicho proceso celular de interés puede estar limitado a una parte de dicha planta como hojas o semillas. Un proceso celular de interés en semillas puede ser la producción de una proteína de interés en semillas, mediante el cual la proteína de interés se puede recoger fácilmente mediante métodos convencionales y almacenarse en dicha semilla. Sin embargo, preferiblemente, el proceso celular de interés afecta a partes sustanciales de dicha planta. La parte de una planta en la que dicho proceso celular se activa depende, entre otros, del lugar o los lugares de aplicación de dicho polipéptido. En general, dicho proceso celular de interés puede ser más fuerte en las cercanías del lugar de aplicación de dicho polipéptido y puede disminuir al aumentar la distancia de dicho lugar. Dicha disminución puede ser, en general, anisotrópica y depender de la estructura del tejido de dicha planta donde se ha aplicado dicho polipéptido. Si, por ejemplo, un proceso celular de interés se tiene que activar (por ejemplo, la expresión de un gen de interés se tiene que activar) y dicho polipéptido se aplica a una fracción de una hoja de la planta, dicho proceso celular de interés típicamente ocurre dentro de dicha fracción de dicha hoja y en las cercanías de dicha fracción de dicha hoja. Preferiblemente, dicho proceso celular de interés ocurre en la parte principal de dicha hoja. Más preferiblemente, dicho proceso celular de interés ocurre también en el brote y en otras hojas. Más preferiblemente, dicho proceso celular de interés ocurre en la parte principal de dicha planta. El alcance de dicho proceso celular de interés (por ejemplo, la expresión de un gen de interés) puede variar dentro de dicha planta, por ejemplo, con el tipo de célula o el tipo de tejido. Obviamente, la aplicación de dicho polipéptido normalmente no está limitada a un punto único en la superficie de una planta. Preferiblemente, dicho polipéptido se aplica a varias partes de dicha planta (véase adicionalmente más adelante).

El proceso celular de acuerdo con la invención puede comprender o dar origen a una cascada bioquímica completa de interés como una ruta biosintética multietapa en células de la planta. El proceso celular o cascada biológica de interés no es operativo en la planta antes de la exposición a dicho polipéptido. El método de la invención puede proporcionar control sobre un proceso celular o cascada bioquímica de interés con una precisión técnica inalcanzable hasta ahora y seguro para el entorno. De ese modo, están disponibles aplicaciones novedosas en biotecnología general, específicamente en biotecnología de planta, para resolver problemas que no se pueden resolver mediante tecnologías convencionales como actividad de expresión transgénica basal en una planta, particularmente cuando se producen sustancias tóxicas o polímeros biodegradables. Además, el control preciso de acuerdo con la invención permite cultivar una planta transgénica hasta una etapa deseada en la que, por ejemplo, la planta es más adecuada para realizar el proceso celular de interés sin cargar a la planta con una actividad de expresión basal que reduzca la velocidad de creci-

miento de la planta. Una vez que la planta está lista para realizar eficazmente el proceso celular de interés, el proceso de interés se puede activar y realizar con gran eficacia. Por consiguiente, el método de la invención permite desacoplar de manera segura la fase de crecimiento y la fase de producción de un organismo multicelular, específicamente una planta transgénica. Además, es posible diseñar sistemas multicomponente para múltiples procesos celulares o cascadas biológicas de interés, mediante los cuales uno o más procesos o cascadas deseados se pueden activar de forma selectiva.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 es un esquema del método de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 es una representación esquemática de un método de acuerdo con la invención, en la que el polipéptido es una proteína activa (funcional) (AB), C indica un ADN heterólogo y sus productos de expresión (ARN o proteína). Se indica que el ARN tiene ribosomas unidos. En la célula de una planta, la proteína activa (AB) puede interactuar (1) con dicho ácido nucleico heterólogo, (2) con productos de expresión de ARN (no es una realización de esta invención) o (3) con un producto de expresión de proteína de dicho ácido nucleico heterólogo (no es una realización de esta invención), para activar un proceso celular de interés.

La Fig. 3 (no es una realización de esta invención) es una representación esquemática de un método en el que dicho polipéptido es una proteína no funcional (AB) la cual después de la introducción directa en la célula vegetal se convierte en una forma activa A'B' bajo la influencia de un factor codificado por un ácido nucleico heterólogo C. D indica un ácido nucleico heterólogo adicional (o ARN o productos de expresión de proteína del mismo) que está dirigido por la proteína A'B', activando de ese modo un proceso celular de interés. Dicha conversión a la forma activa A'B' puede tener lugar, por ejemplo, mediante una actividad enzimática de un producto de expresión de C o mediante corte y empalme *trans* mediado por inteína.

La Fig. 4 es un esquema que muestra ejemplos para generar una proteína interruptora activa a partir de fragmentos proteicos inactivos en una célula vegetal. A: generación de una proteína interruptora activa mediante corte y empalme *trans* de fragmentos proteicos mediado por inteína. B: generación de una proteína interruptora activa mediante unión por afinidad de fragmentos proteicos.

La Fig. 5 es un esquema que muestra el ensamblaje de una proteína funcional (AB) a partir de fragmentos proteicos no funcionales A y B mediante corte y empalme *trans* mediado por inteína (Fig. 5A) o interacción por afinidad (Fig. 5B). El fragmento A es el polipéptido de la invención que se importa a la célula. El fragmento B se expresa internamente a partir de un ácido nucleico heterólogo (no es una realización de esta invención).

La Fig. 6 es un esquema general que muestra la activación de un proceso celular de interés a través de una proteína interruptora que tiene capacidad de tránsito intercelular y de provocar su propia expresión en otras células. PS se refiere a proteína interruptora, TP se refiere a proteína de tránsito con capacidad de tránsito intercelular (es decir, de dejar a una célula y entrar en otras células), PS:TP se refiere a una proteína de fusión de PS-TP, hNA se refiere a un ácido nucleico heterólogo adicional.

(A) representa un ácido nucleico heterólogo que codifica PS:TP y un ácido nucleico heterólogo adicional (hNA). No se introduce polipéptido externo, por tanto la proteína interruptora no se expresa y no se activa ningún proceso celular de interés.

(B) se introduce un polipéptido externo (permeable a células) que provoca la expresión de la proteína interruptora PS:TP. La proteína interruptora puede controlar un proceso celular actuando sobre hNA en la célula de su expresión. Además, la proteína interruptora puede partir de la célula que se desencadenó mediante dicho polipéptido introducido externamente y entrar a otras células. En otras células, la proteína interruptora puede inducir su propia expresión y también controlar el proceso celular actuando sobre hNA.

(C) representa un ácido nucleico heterólogo que codifica dos proteínas interruptoras: PS1 y PS2. La expresión de PS1 se produce por una señal aplicada externamente (el polipéptido de la invención, que conduce a PS1:TP). Como anteriormente, PS1:TP se puede propagar a otras células y activar la expresión de PS2. A su vez, PS2 puede controlar un proceso celular actuando sobre hNA.

La Fig. 7 representa en (A) la construcción pICHGFP_{inv} que contiene un provector basado en TMV no funcional y en (B) un derivado funcional de dicha construcción que se produce como resultado de la recombinación mediada por integrasa. Las flechas en la parte inferior indican ARN y ARN subgenómicos (sg) incluyendo su orientación que se puede formar a partir de la construcción basada en (B). sgp se refiere a promotor subgenómico.

La Fig. 8 representa esquemáticamente un método de acuerdo con la invención, en el que un polipéptido permeable en células (MTS:recombinasa) desencadena acontecimientos de recombinación dentro de células diana, que conducen a la formación de una proteína interruptora con capacidad de tránsito intercelular (recombinasa:TP) a partir de un ácido nucleico heterólogo (la construcción que codifica recombinasa:TP). La proteína interruptora puede adicionalmente desencadenar acontecimientos de recombinación que conducen a rearreglo de un provector basado en virus vegetal (un ácido nucleico heterólogo adicional de acuerdo con la invención) que da como resultado la expresión de un gen

de interés (GOI). MTS: secuencia de translocación de membrana; TP: proteína con capacidad de tránsito intercelular; SM: marcador seleccionable; RS: sitio de recombinación reconocido por recombinasa/integrasa de ADN específica de sitio; ter1 y ter2: regiones de terminación de transcripción; PROM: promotor activo en plantas; RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN viral; MP: proteína de movimiento; 3'NTR: región no traducida 3' de virus de ARN vegetal. Las flechas muestran la orientación de las secuencias codificantes y reguladoras.

La Fig. 9 muestra vectores para producir proteínas phiC31 de integrasa fusionadas a señales de translocación de membrana (MTS). Los vectores pICH13180 y pICH13190 contienen el extremo 5' de un vector basado en TMV con una MTS de elección y están diseñados para ensamblaje mediado por recombinación específica de sitio con un vector (pICH13591) que contiene un extremo 3' de un vector basado en TMV que codifica la integrasa phiC31 con señal de localización nuclear (NLS) en su extremo C terminal.

Descripción detallada de la invención

La base de esta invención es el uso de un polipéptido capaz de entrar en la célula de una planta, conduciendo a la activación del proceso celular de interés sin administración de ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido o una parte funcional de dicho polipéptido en dichas células. Preferiblemente, dicha activación de un proceso celular de interés comprende formar una proteína que sea capaz de provocar su propia expresión. El principio general del método de acuerdo con la invención se muestra esquemáticamente en las Figuras 1 a 9.

Elección de proteína para función "interruptora"

Existe técnica anterior abundante que describe con detalle cómo, por ejemplo, una recombinasa o una integrasa específica de sitio pueden desencadenar un proceso de interés mediante escisión de ADN o inversión en células, concretamente en células de planta (Zuo, Moller & Chua, 2001, Nat. Biotech., 19, 157-161; Hoff, Schnorr & Mundy, 2001, Plant Mol. Biol., 45, 41-49; documentos US5225341; WO9911807; WO9925855; US5925808; US6110736 WO0140492 y WO 0136595). Las recombinasas/integrasas específicas de sitio de bacteriófagos y levaduras se usan ampliamente para manipular ADN *in vitro* y en plantas y animales. Los sitios preferidos de recombinación - recombinasas para el uso en esta invención son los siguientes: sitio de recombinación de recombinasa-*LoxP* Cre, sitios de recombinación de recombinasa-*FRT* FLP; sitios de recombinación de recombinasa-*RS* R, sitios de reconocimiento attP/attB de integrasa de fago C31, etc.

Introducir directamente dicho polipéptido en células de una planta

a) *Bombardeo de microproyectoril (bombardeo de partículas)*

Se pueden usar diferentes métodos para introducir directamente (administración directa) dicho polipéptido en células de dicha planta. Entre los más sencillos está la administración directa con la ayuda de interacción mecánica con tejido de la planta. Por ejemplo, el bombardeo con microproyectoril de partículas recubiertas con polipéptido puede administrar dicho polipéptido a las células de la planta. El protocolo puede ser similar a los que se han descrito para la administración de ADN en protocolos de transformación de planta (documentos US 05100792; EP 00444882B1 y EP 00434616B1). Sin embargo, en lugar de ADN, dicho polipéptido se puede usar para recubrir las partículas. Existe una descripción de un proceso biolístico que usa métodos de recubrimiento de partículas que son razonablemente moderados para conservar la actividad de dicho polipéptido (Sanford, Smith & Russell, 1993, Methods in Enzymol., 217, 483-509). En principio, también se pueden usar otros métodos de transformación de planta, por ejemplo, microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1 y EP 175966B1) o administración mediada por liposomas (para una revisión véase: Fraley & Papahadiopoulos, 1982, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 96, 171-191).

b) *Uso de secuencias de aminoácidos de translocación de membrana*

El polipéptido de interés se puede aplicar externamente a células diana de dicha planta usando una fusión covalente con una secuencia de translocación de membrana. Muchos ejemplos de secuencias de translocación de membrana (MTS), naturales y sintéticas, se conocen en la técnica. Los mismos se usan ampliamente como fusiones con fármacos peptídicos y proteínas terapéuticas para aumentar su permeabilidad a la membrana celular. Una MTS puede ser una repetición de aminoácidos sencilla, por ejemplo, un péptido catiónico que contienen once argininas RRRRRRRRRRRR (Matsushita *et al.*, 2001, J. Neurosci., 21, 6000-6007). Otra MTS catiónica es un transportano largo de 27 aminoácidos (GWTLNSAGYL LGKINKALA ALAKKIL) (Pooga *et al.*, 1998, FASEB J., 12, 67-77). Es muy probable que tales polipéptidos, para su penetración en la célula, se aprovechen de la asimetría de la membrana plasmática celular donde la monocapa lipídica orientada al citoplasma contiene fosfolípidos aniónicos (Buckland & Wilton, 2000, Biochim. Biophys. Acta/Mol. Cell. Biol. Of Lipids, 1483, 199-216). Determinadas proteínas también pueden contener subunidades que posibilitan su translocación activa a través de la membrana plasmática en las células. A tales dominios pertenece el dominio básico de HIV-1 Tat₄₉₋₅₇ (RKKRRQRRR) (Wender *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 13003-13008), Antennapedia₄₃₋₅₈ (RQIKIWQNR RMKWKK) (Derossi *et al.*, 1994, J. Biol. Chem., 269, 10444-10450), la MTS del Factor de Crecimiento de Fibroblastos de Kaposi (AAVALLPAVL LA-LLAP) (Lin *et al.*, 1995, J. Biol. Chem., 270, 14255-14258); la MTS de VP22 (Bennet, Dulby & Guy, 2002, Nat. Biotechnol., 20,20; Lai *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 11297-302); homodominios de las proteínas Fushi-tarazu y Engrailed de *Drosophila melanogaster* (Han *et al.*, 2000, Mol Cells 10, 728-732). Se ha demostrado que todas estas MTS cargadas positivamente son capaces de conseguir la entrada celular por sí mismas y como fusiones con otras proteínas como

GFP (Zhao *et al.*, 2001, J. Immunol. Methods, 254, 137-145; Han *et al.*, 2000, Mol Cells, 10, 728-732), recombinasa Cre (Peitz *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 4489-4494) de una manera independiente de energía. Sin embargo, la función no se requiere necesariamente para el transporte de proteína en la célula. Se ha diseñado un vehículo peptídico de 21 restos Pep-1 (KETWWETVWVW-TEWSQPKKKRKV) que es capaz de formar complejos por medio de interacciones hidrófobas no covalentes con diferentes tipos de proteínas, como GFP, b-Gal o anticuerpos específicos de longitud completa. Estos complejos son capaces de penetrar eficazmente en las membranas celulares (Morris *et al.*, 2001, Nature Biotechnol., 19, 1173-1176). La lista de MTS puede continuar y, en general, cualquier péptido con alto contenido de arginina de origen sintético o natural puede servir para practicar esta invención (Futaki *et al.*, 2001, J. Biol. Chem., 276, 5836-5840).

Ya que no existe una diferencia estructural básica entre las membranas celulares vegetales y animales que afecte su arquitectura y propiedades físico-químicas generales, dichas funciones de MTS con dicho polipéptido de la invención también se pueden usar eficazmente para penetrar células vegetales. Sin embargo, a diferencia de las células animales, las células vegetales poseen una pared celular fuerte (Vamer & Linn, 1989, Cell, 56, 231-239; Minor-sky, 2002, Plant Physiol., 128, 345-53). Este obstáculo se puede superar usando técnicas sencillas. Por ejemplo, la inyección de un extracto de proteína (por ejemplo, crudo) que contiene dicho polipéptido que tiene una MTS en un apoplasto de planta facilita la translocación de dicho polipéptido a las células vegetales. Otro enfoque para superar la pared celular y para alcanzar la membrana celular de las células vegetales puede ser la aplicación de enzimas celulíticas muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Una vez que se han añadido a la composición que contiene dicho polipéptido, dichas enzimas ayudan a retirar o debilitar la pared celular, pero dejarán la membrana celular intacta y expuesta para la penetración mediante dicho polipéptido que contiene dicha MTS. Dichas enzimas celulíticas de bacterias y mohos han estado disponibles en el mercado a escala industrial durante mucho tiempo y se usan ampliamente (por ejemplo, preparación de enzima R-10 "Onozuka" de *Trichoderma harzianum*, etc.) en cultivo de tejidos de células vegetales para obtener protoplastos de planta (Sidorov & Gleba, 1979, Tsitologia, 21, 441-446; Gleba & Gleba, 1978, Tsitol Genet., 12, 458-469; Ghosh *et al.*, 1994, J. Biotechnol., 32, 1-10; Boyer, Zaccomer & Haenni, 1993, J. Gen. Viral., 74, 1911-1917; Hilbricht, Salamini & Bartels, 2002, Plant J., 31, 293-303). El enfoque de uso de enzimas celulíticas tiene potencial para aplicaciones a gran escala de esta invención. Una mezcla de enzimas celulíticas con un polipéptido permeable a célula se puede pulverizar sobre las plantas modificadas genéticamente o sobre parte de las mismas. Las celulasas pueden hacer a las membranas celulares accesibles para los polipéptidos permeables a membrana. Tras la translocación en la célula, dicho polipéptido puede desencadenar dicho proceso celular de interés y la expresión de dicha proteína dentro de la planta.

Además de los métodos de administración anteriores para dicho polipéptido, la propagación eficaz de una proteína interruptora dentro de la planta se usa preferiblemente con propósitos de amplificación dentro dicha planta. Además, para hacer que el método global sea seguro, se necesita un control estricto sobre el ácido nucleico heterólogo.

Para dirigirse a estos asuntos se propone en este documento usar un enfoque de "genes discontinuos" (o "proteínas discontinuas") para controlar la segregación de un transgen que codifica la proteína interruptora. Una proteína interruptora activa (funcional) se puede ensamblar mediante corte y empalme *trans* de proteína mediado por inteína (Fig. 4-A y Fig. 5-A) o mediante interacción por afinidad (Fig. 4-B y Fig. 5B). En este caso, la proteína interruptora no está codificada por una secuencia de ADN continua y su uso se puede controlar mucho mejor. Una proteína interruptora activa de este tipo se puede, por ejemplo, ensamblar a partir de dicho polipéptido y una proteína expresada en células de dicha planta (por ejemplo, a partir del ácido nucleico heterólogo) mediante corte y empalme *trans* de proteína mediado por inteína o mediante interacción por afinidad. La proteína expresada a partir de dicho ácido nucleico heterólogo y dicho polipéptido puede generar en conjunto una función predeterminada que conduzca a la activación de dicho proceso celular de interés sólo cuando la proteína y dicho polipéptido estén presentes en conjunto. La proteína expresada a partir de dicho ácido nucleico heterólogo puede, por ejemplo, expresarse de forma constitutiva, mediante lo cual el proceso de interés se puede activar aplicando dicho polipéptido. Como alternativa, la proteína expresada a partir de dicho ácido nucleico heterólogo puede estar bajo el control de un promotor regulado (por ejemplo, un promotor químicamente inducible), que permita un control "doble" del proceso de interés, concretamente mediante inducción del promotor regulado y la introducción de dicho polipéptido. Más importante, estas realizaciones tienen una seguridad biológica excepcional. El corte y empalme *trans* mediado por inteína y la interacción por afinidad se describen a continuación.

El corte y empalme *trans* mediado por inteína de proteínas con restauración de su actividad se conoce en la técnica anterior y se ha descrito con detalle en muchas publicaciones. La interacción por afinidad y/o el corte y empalme *trans* se puede conseguir usando inteínas modificadas genéticamente (Fig. 4-A). Las inteínas se identificaron en primer lugar como secuencias de proteína incrustadas en fase de lectura dentro de un precursor proteico y eliminadas durante el proceso de maduración de proteína (Perler *et al.*, 1994, Nucleic Acids Res., 22, 1125-1127; Perler, F.B., 1998, Cell, 92, 1-4). Toda la información en los grupos catalíticos necesarios para realizar una reacción de autocorte y empalme residen en la inteína y dos aminoácidos flanqueantes. El mecanismo químico de corte y empalme de proteínas se describe con detalle por Peler y sus colegas (1997, Curr. Opin. Chem. Biol., 1 292-299) y por Shao y Kent (1997, Chem. Biol., 4, 187-194). Las inteínas habitualmente consisten en regiones de corte y empalme N-terminal y C-terminal y una región de endonucleasa buscadora central o región de enlazador pequeña. Hasta el momento se conocen más de 100 inteínas que están distribuidas entre los genomas nucleares y de las organelas de diferentes organismos incluyendo eucariotas, arqueobacterias y eubacterias (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>). Se ha demostrado que las inteínas tienen capacidad de corte y empalme *trans*: la remoción de la región de endonucleasa buscadora central no tiene ningún efecto sobre el autocorte y empalme de inteínas. Esto ha hecho posible el diseño de sistemas de corte

y empalme *trans*, en los que los fragmentos N-terminal y C-terminal de una inteína se coexpresan como fragmentos separados y, cuando se fusionan a exteínas (fragmentos de proteína que están ligados entre sí con la ayuda de la inteína), pueden realizar corte y empalme *trans in vivo* (Shingledecker *et al.*, 1998, *Gene*, 207, 187-195). También se ha demostrado con segmentos N y C terminal de la inteína RecA de *Mycobacterium tuberculosis*, que el corte y empalme *trans* de proteína puede tener lugar *in vitro* (Mills *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95, 3543- 3548). Este fenómeno también se ha identificado para la proteína DnaE de *Synechocystis sp.* cepa PCC6803 (Wu *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95, 9226-9231). Dos genes diferentes localizados separados a más de 700 Kb.p. en hebras de ADN opuestas codifican esta proteína. También se ha demostrado que dos secuencias de inteína codificadas por esos genes reconstituyen una mini inteína discontinua y son capaces de mediar la actividad de corte y empalme *trans* de proteína cuando se ensayan en células de *Escherichia coli*. Una inteína del mismo origen (inteína DnaE de *Synechocystis sp.* cepa PCC6803) se usó para producir acetolactato sintetasa 11 resistente a herbicida funcional a partir de dos fragmentos no enlazados (Sun *et al.*, 2001, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1025-29) y 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (Chen *et al.*, 2001, *Gene*, 263, 39-48) en *E. coli*.

El corte y empalme *trans* de fragmentos de proteína (incluyendo formación de enlace covalente entre exteínas) no se requiere necesariamente para restaurar la función original de la proteína discontinua. En muchos casos, la interacción por afinidad entre partes de proteína sin formación de enlace peptídico es suficiente para restaurar la función de proteína (Fig. 4-B). Este enfoque es más satisfactorio (como en el caso de corte y empalme *trans* mediado por inteína) con proteínas que tienen dos o más dominios funcionales. En este caso, los dominios se pueden separar unos de los otros separando la secuencia codificante entre dos vectores de transcripción y se pueden unir mediante interacciones definidas mediadas por proteína (Fig. 5-B). Los dominios de proteína pueden interactuar sin la necesidad de usar inteínas de interacción.

Existe un ejemplo de actividad reconstituyente de la transposasa IS10 que consiste en dos dominios estructurales conectados por una región enlazadora sensible a proteólisis (Kwon, Chalmers & Kleckner, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 92, 8234-8238). Cada uno de los dominios por separado es incapaz de proporcionar la función de transposasa. Cuando se añaden en conjunto, sin embargo, los mismos son capaces de proporcionar transposiciones incluso sin estar conectados por una región enlazadora. Existen muchos otros ejemplos de la reconstitución de proteínas funcionales a partir de fragmentos aislados sin formación de enlaces peptídicos. El ensamblaje eficaz de un sitio de unión de receptor de insulina funcional se consiguió mediante mezcla sencilla de fragmentos no funcionales (Kristensen *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 18346-18345). La reconstitución de proteínas activas mediante mezcla sencilla de dos fragmentos peptídicos inactivos se demostró para leucina deshidrogenasa (Oikawa *et al.*, 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1177-1182), proteína de unión a Ca^{2+} - calbindina D28k (Berggard *et al.*, 2000, *Protein Sci.*, 9, 2094-2108; Berggard *et al.*, 2001, *Biochemistry*, 40, 1257-1264), regulador del desarrollo COP1 de *Arabidopsis* (Stacey *et al.*, 2000, *Plant Physiol.*, 124, 979-990), receptor de dopamina D (Scarselli *et al.*, 2000, *Eur. J. Pharmacol.*, 397, 291-296), microplasminógeno (De Los Santos, Wang & Reich, 1997, *Ciba Found. Symp.*, 212, 76-83) y muchos otros.

Los dominios de cremallera de leucina son de especial interés para formar heterodímeros de proteína una vez que se han fusionado a una proteína de interés (Riecker & Hu, 2000, *Methods Enzymol.*, 328, 282-296; Liu *et al.*, 2001, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2, 107-121). Un ejemplo interesante es el control de interacciones proteína-proteína con una molécula pequeña. Por ejemplo, la recombinasa Cre se modificó genéticamente en una forma tal que, cuando se separó en dos fragmentos inactivos, fue capaz de restaurar el 100% de su actividad de recombinasa en presencia de la molécula pequeña rapamicina que desencadenó la actividad de complementación mediante heterodimerización entre dos fragmentos inactivos (Jullien *et al.*, 2003, *Nucleic Acids Res.*, 31, e131). Rapamicina y, preferiblemente análogos no tóxicos, también se pueden usar para corte y empalme de proteína condicional; donde los mismos desencadenan una reacción de corte y empalme *trans* (Mootz *et al.*, 2003, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 10561-10569). En varios artículos se describen enfoques similares para la regulación de las interacciones proteína-proteína con la ayuda de moléculas pequeñas, tales como rapamicina o análogos de rapamicina (Amara *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 94, 10618-10623; Pollock *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 97, 13221-13226; Pollock *et al.*, 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20, 729-733). Se pueden usar muchos otros dimerizadores químicos tales como dexametasona y metotrexato, para ensamblar homo o heterodímeros activos a partir de fragmentos de proteína inactivos (para una revisión véase: Pollock & Clackson, 2002, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 459-467).

Las interacciones de afinidad se pueden modificar por ingeniería genética eficazmente usando dominios de proteína de interacción de origen natural o identificando tales dominios con la ayuda de sistemas de dos híbridos (Fields & Son, 1989, *Nature*, 340, 245-246; Chien *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88, 9578-9582; Yeast Protocol Handbook, Clontech Laboratories, Inc., 2000) o de presentación en fago. Por ejemplo, la presentación en fago se puede usar para seleccionar un oligopéptido de 5-12 unidades con afinidad elevada por un fragmento de proteína de interés. Varios de tales sistemas están disponibles en el mercado actualmente. La presentación en fago es una técnica de selección en la que un oligopéptido corto de 5-12 unidades variables se inserta en una proteína de cubierta de un bacteriófago. La secuencia que codifica este oligopéptido variable se incluye en el gen correspondiente de la proteína de cubierta del bacteriófago. Habitualmente, una biblioteca de presentación en fago de 7 unidades tiene al menos 10^9 clones independientes que portan combinaciones diferentes de aminoácidos de 7 unidades en oligopéptidos variables. La presentación en fago se ha usado para crear complejos de afinidad entre bacteriófagos y una proteína de interés, permitiendo la identificación rápida de ligandos peptídicos para proteína diana dada mediante un proceso de selección *in vitro* denominado "panning" (selección) (Parmley, Smith, 1988, *Gene* 73, 305-318; Cortese *et al.*, 1995, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6 73-80). El complejo fago-proteína creado después del procedimiento de selección se puede disociar y

se puede amplificar un fago con afinidad por una proteína diana. Habitualmente, se necesitan tres ciclos de selección para obtener bacteriófagos con afinidad alta. Después de tres ciclos, los clones individuales se pueden caracterizar mediante secuenciación de región variable en el ADN genómico. Dicho sistema se puede adoptar eficazmente para identificar oligopéptidos de interacción cortos y usarlos como etiquetas de afinidad para unir fragmentos de proteína juntos. Otro enfoque incluye el uso de dominios de interacción de origen natural como repeticiones con alto contenido de leucina (Kobe & Deisenhofer, 1994, Trends Biochem Sci., 19, 415-421; Kobe & Kajava, 2001, Curr. Opin. Struct. Biol., 11, 725-732), dedos de cinc (Grossley, Merika & Orkin, 1995, Mol. Cell. Biol., 15, 2448-2456), repeticiones de anquirina (Thompson, Brown & McKnight, 1991, Science, 253, 762-768), dominios de cromo (Paro & Hogness, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88, 263-267; Singh *et al.*, 1991, Nucleic Acids Res., 19, 789-793) y muchos otros implicados en interacciones proteína-proteína. Sin embargo, se pueden tomar en cuenta la posibilidad de implicar no sólo los fragmentos de proteína modificados genéticamente que contienen las fusiones de motivo en interacciones proteína-proteína, sino también proteínas endógenas.

Implicar las interacciones proteína-proteína para activar un proceso celular de interés como expresión génica tiene, entre otros, las siguientes ventajas: en primer lugar, el sistema se puede volver altamente específico, ya que la función de interés es un resultado de una interacción altamente específica proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, que se caracteriza por un estado no inducido de nivel cero y ausencia de filtración inespecífica. Esto contrasta con los sistemas de técnica anterior tales como interruptores basados en moléculas pequeñas que son intrínsecamente menos específicos y muestran invariablemente un determinado grado de filtración. En segundo lugar, dicha proteína interruptora o un fragmento de la misma (o dicho polipéptido o un fragmento del mismo) se puede administrar directamente a células de una planta sin un vector de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido, permitiendo de ese modo la dosificación precisa de dicho polipéptido. Esto hace que la administración directa de dicha proteína interruptora (o dicho polipéptido) a células de una planta sea comparable con el uso de moléculas pequeñas para desencadenar un proceso necesario en células. En tercer lugar, sistema es intrínsecamente ambientalmente más seguro de los sistemas de la técnica anterior que contienen información genética completa de la proteína de interés (en una forma de ácido nucleico lineal o fragmentos de dicho ácido nucleico), ya que permite que el organismo en cuestión no contenga la información genética completa necesaria para la expresión de una proteína de interés. De acuerdo con el dogma central de biología molecular, los sistemas biológicos no pueden traducir de forma inversa proteínas a ácidos nucleicos. Por tanto, la "ingeniería genética inversa" de la información genética suficiente para expresión de un rasgo funcional por un organismo vivo es imposible. En cuarto lugar, el sistema proporciona un bloqueo específico que se podría usar para prohibir el uso no autorizado del sistema. El uso de dicho polipéptido como un componente de un extracto de proteína crudo a partir de un organismo que expresa dicho polipéptido o dicho fragmento polipeptídico hace prácticamente muy difícil identificar el componente activo de dicho extracto.

Propagación de la proteína interruptora dentro de una planta para desencadenar un proceso celular de interés

Aquí, se proporciona un enfoque para superar el problema del bajo número de células de una planta que se pueden alcanzar mediante el polipéptido aplicado externamente: dicho polipéptido puede conducir a la formación de una molécula de proteína interruptora intracelular con capacidad de movimiento de célula a célula o sistémico. Además, dicho polipéptido puede conducir o puede causar la formación de un vector basado en virus (amplificación) que expresa un gen de interés o una parte del mismo y que tiene capacidad de movimiento de célula a célula o sistémico en dicha planta. En estos enfoques, el movimiento de vectores virales o moléculas de proteínas interruptoras o ambos puede conducir a la propagación de un proceso celular y/o cascada biológica a través de partes significativas de dicha planta e incluso a través de toda la planta modificada genéticamente.

En el Ejemplo 1 de esta invención, la proteína interruptora contiene una integrasa phiC31 para convertir un vector precursor de un vector viral en un vector viral. El vector viral tiene capacidad de amplificación, movimiento de célula a célula y sistémico. La recombinación mediada por integrasa entre los sitios attP y attB de pICHGFPinv (Fig. 7-A) conduce a la inversión de un fragmento de ADN flanqueado por dichos sitios y la formación de un vector viral capaz de amplificación y expresión de un gen de interés (GFP) (Fig. 7-B). Esto se puede conseguir como el resultado de colocar componentes virales (región 3' no traducida 3'NTR; proteína de envuelta CP) necesarios para la amplificación de vectores y el transporte sistémico en orientación sentido con relación a un promotor activo en la planta en cuestión como el promotor de actina 2 en este ejemplo. Por tanto, junto con otros componentes del vector viral (por ejemplo, RdRp y CP) pueden formar un ADNc que tras la transcripción accionada por el promotor de actina 2 forma un vector viral de ARN con capacidad de amplificación, de un movimiento de célula a célula y sistémico. Opcionalmente, dicho vector se puede modificar adicionalmente retirando el gen CP (proteína de envuelta). Un vector de este tipo que carece del gen CP todavía tendrá capacidad de movimiento de célula a célula. La construcción de sistemas de expresión basados en virus vegetales para la expresión de genes no virales en plantas se ha descrito en varios artículos (Dawson *et al.*, 1989, Virology, 172, 285-293; Brisson *et al.*, 1986, Methods in Enzymology, 118, 659; MacFarlane & Popovich, 2000, Virology, 267, 29-35; Gopinath *et al.*, 2000, Virology, 267, 159-173; Voinnet *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 96, 14147-14152) y revisiones (Porta & Lo-monossoff, 1996, Mol. Biotechnol., 5, 209-221; Yusibov *et al.*, 1999, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 240, 81-94) y se puede realizar fácilmente por los expertos en la materia. Los sistemas de expresión basados en vectores ofrecen una producción significativamente más alta de un producto transgénico en comparación con los transgenes nucleares de planta. Por ejemplo, el nivel de una proteína codificada transgénicamente puede alcanzar del 5-10% del contenido de proteína de planta celular total cuando se expresa a partir de un vector viral (Kumagai *et al.*, 2000, Gene, 245, 169-174; Shivprasad *et al.*, 1999, Virology, 255, 312-323). Los virus de ARN son los más adecuados ya que los mismos ofrecen un nivel de expresión más elevado en comparación con los virus de ADN. Existen varias patentes publicadas que describen vectores virales

adecuados para expresión sistémica de material transgénico en plantas (los documentos US5316931; US5589367 y US5866785). En general, estos vectores pueden expresar un gen extraño como una fusión traduccional con una proteína viral (los documentos US5491076 y US5977438), a partir de un promotor subgenómico adicional (los documentos US5466788; US5670353; US5866785), o a partir de ARN viral policistrónico usando elementos de IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) para traducción de proteína independiente (Solicitud de Patente Alemana DE 10049587).

El primer enfoque, la fusión traduccional de una proteína recombinante con una proteína estructural viral (Hamamoto *et al.*, 1993, BioTechnology, 11, 930-932; Gopinath *et al.*, 2000, Virology, 267, 159-173; los documentos JP6169789 y US5977438) da una producción significativa de un producto de proteína recombinante. Sin embargo, la utilidad de este enfoque es limitada, ya que la proteína recombinante no se puede separar fácilmente de la viral. Una alternativa de este enfoque emplea una fusión traduccional a través de una secuencia peptídica reconocida por una proteasa específica de sitio viral o a través de un péptido catalítico (Dolja *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89, 10208-10212; Gopinath *et al.*, 2000, Virology, 267, 159-173; documentos US5162601; US5766885 y US5491076). Los procesos de expresión que utilizan vectores virales construidos en promotores subgenómicos heterólogos proporcionan el nivel más alto de producción de proteína hasta la fecha (el documento US5316931). La desventaja más grave de los vectores virales y muchos otros es su capacidad limitada con respecto al tamaño del ADN que el mismo amplifica. Habitualmente, las construcciones estables alojan insertos de no más de un kb. En algunas áreas de la genómica funcional de plantas esto puede no ser una limitación grave, ya que G. della-Cioppa *et al.* (en el documento WO993651) ha descrito el uso de vectores virales basados en TMV para expresar bibliotecas de ADNc de planta con el propósito de silenciar genes endógenos. Los sistemas de amplificación de dos componentes que hacen uso de los virus auxiliares pueden ofrecer una capacidad ligeramente mejor (documento US5889191). Otros sistemas basados en casetes de expresión que se integran de forma estable en el genoma de la planta contienen el promotor 35S marcado que dirige la expresión de amplicones basados en vector viral. Estos sistemas habitualmente están sujetos a silenciamiento génico post-traduccional (PTGS) (Angell & Baulcombe, 1997, EMBO J., 16, 3675-3684). El uso de supresores de PTGS es necesario para superar tal silenciamiento (el documento WO01385712). Se necesita realizar cruces entre plantas que portan el amplicón silenciado y plantas que portan la fuente de supresor de PTGS (Mallory *et al.*, 2002, Nature Biotechnol., 20, 622-625) para conseguir producción a gran escala de una proteína de interés con ayuda de un sistema de este tipo. Evidentemente, un sistema de este tipo no tiene flexibilidad ni control estricto sobre la expresión transgénica y está limitado a la producción de proteínas que no comprometen el crecimiento y desarrollo de la planta.

Nuestro enfoque permite superar las limitaciones de los sistemas de vector viral descritos anteriormente, específicamente su capacidad limitada del tamaño del gen a expresar y la carencia de flexibilidad para controlar la expresión. En esta invención, el precursor de vector viral (también denominado provector) preferiblemente está presente en cada célula de la planta transgénica. En el caso de expresión de genes grandes (superior a 1 kb), se prefiere el movimiento de proteína interruptora por encima del movimiento del vector viral. Los vectores virales pueden amplificarse eficazmente en células y el tamaño del inserto de un vector viral afecta en su mayoría la capacidad de movimiento célula a célula y sistémico. Por lo tanto, proporcionar una proteína interruptora móvil capaz de activar un vector viral para muchas células o incluso para todas las células de la planta hospedadora resolverá el problema mencionado anteriormente. Adicionalmente, para proporcionar un sistema con una función interruptora eficaz que sea capaz de activar la amplificación de un vector viral de este tipo en la mayoría si no en todas las células de la planta hospedadora, se usan proteínas interruptoras con capacidad de movimiento de célula a célula/sistémico en la presente invención. Con este fin, la proteína interruptora puede contener una parte de proteína que vuelve a dicha proteína con capacidad de movimiento de célula a célula y/o sistémico. Los ejemplos de tales partes de proteína capaces de tránsito intercelular se conocen en la técnica anterior. Existe evidencia de que factores de transcripción de planta, proteínas relacionadas con la defensa y proteínas virales pueden transitar a través del plasmodesmata (para una revisión véase: Jackson & Hake, 1997, Curr. Opin. Genet. Dev., 7, 495-500; Ding, B. 1998, Plant Mol. Biol., 38, 279-310; Jorgensen RA., 2000, Sci STKE, 58, PE2; Golz & Hudson, 2002, Plant Cell, 14, S277-S288). Se ha demostrado que una fusión de una proteína de movimiento 3a del virus del mosaico del pepino con GFP puede transitar hacia fuera a través de plasmodesmata hasta células vecinas (Itaya *et al.*, 2002, Plant Cell, 14, 2071-2083). Tales fusiones también demostraron movimiento a través del floema a partir del rizoma transgénico al vástago no transgénico. La proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (TMV), P30, transita entre células a través de plasmodesmata y, al afectar el tamaño del plasmodesmata, facilita el movimiento de muchas otras macromoléculas grandes no especificadas para tal movimiento (Citovsky *et al.*, 1999, Phil. Trans. RSoc. London B Biol. Sci., 354, 637-643; Ding, Itaya & Woo, 1999, Int Rev. Cytol., 190, 251-316). La fusión P30:GFP mostró movimiento entre las células independiente de las condiciones fisiológicas, mientras que la difusión de GFP no dirigida a través de plasmodesmata depende en su mayoría del estado fisiológico de las células vegetales (Crawford & Zambryski, 2001, Plant Physiol., 125, 1802-1812). La fusión de GFP con el factor de transcripción knotted1 también demostró la capacidad de tránsito intercelular. La proteína de fusión GFP:KN1 demostró movimiento entre los tejidos internos de la hoja hasta la epidermis, entre las células epidémicas hasta el meristema apical del brote de la planta de tabaco (Kim *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 99, 4103-4108). El plasmodesmata juega un papel importante en tal tránsito y su estado y estructura fisiológica son importantes para la eficacia de tal tránsito. Por ejemplo, el plasmodesmata sencillo permite el tránsito inespecífico de proteínas en hojas de tabaco en desarrollo, mientras que las ramificadas no (Oparka *et al.*, 1999, Cell, 98, 5-8). Permitir el tránsito de macromoléculas incluyendo proteínas parece ser una función normal de plasmodesmata, el cual fue utilizado por virus vegetales para su propagación de célula a célula (Fujiwara *et al.*, 1993, Plant Cell, 5, 1783-1794). En general, es evidente que el plasmodesmata y el floema juegan un papel importante en el transporte y en la administración de macromoléculas de información (proteínas y ácidos nucleicos) (Ruiz-Medrano *et al.*, 2001, Curr. Opin. Plant Biol., 4, 202-209). Las proteínas sap de floema de *Cucurbita maxima* y *Ricinus communis* tienen la capacidad de transitar de célula a célula a través del plasmodesmata (Balachandran *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 94, 14150-14155).

La Figura 8 muestra esquemáticamente posibilidades para conseguir el movimiento intercelular de la proteína interruptora de la invención. Una proteína interruptora administrada externamente (es decir dicho polipéptido) y la proteína interruptora sintetizada dentro de una célula pueden ser fusiones de los mismos o segmentos diferentes de proteína a señales de transporte o tránsito. En este ejemplo (Figura 8), el mismo segmento de proteína, por ejemplo, una recombinasa, se fusiona con una señal de translocación de membrana (MTS) para permeabilidad de membrana celular para formar dicho polipéptido de la invención o con una porción de proteína (TP) que proporciona tránsito intercelular para formar dicha proteína interruptora. Es muy probable que para proteínas pequeñas (como GFP y más pequeñas), la fusión a TP pueda no ser necesaria, ya que las mismas pueden tener capacidad de movimiento de célula a célula altamente eficaz mediante difusión sencilla. Sin embargo para proteínas interruptoras más grandes, la fusión con una TP o un fragmento activo de la misma es provechosa. Es evidente que entre todas las proteínas implicadas en el tránsito intercelular, se ha estudiado que las proteínas virales son las mejores. Las mismas son los candidatos más preferidos para incluirse en una proteína interruptora. Como se muestra en la Figura 8, un polipéptido administrado externamente puede desencadenar la expresión de un transgen que codifica una proteína interruptora que tiene la misma actividad enzimática, pero que tiene capacidad de tránsito intercelular (recombinasa:TP). Dicha proteína interruptora con capacidad de tránsito puede desencadenar la expresión de proteína interruptora en todas las células afectadas, lo que representa una reacción en cadena. La disponibilidad de dicha proteína interruptora en la célula es un pre-requisito para desencadenar la expresión de un gen de interés (GOI) en células mediante rearrreglo de ADN, provocando formación de amplicón basada en vector viral. El tamaño del gen de interés expresado a partir de un amplicón de este tipo no es un factor limitante para la expresión de GOI eficaz, ya que la estabilidad de amplicón y el movimiento de célula a célula no son necesarios en este sistema. El provector viral puede estar presente en cada célula vegetal y la propagación de la proteína interruptora puede desencadenar la expresión del gen de interés en cada una de estas células. Sin embargo, preferiblemente, la propagación del amplicón contribuye a la expresión de GOI eficaz.

El propósito fundamental del sistema de proteína interruptora que se contempla en este documento es un control funcional de un proceso celular de interés o una cascada de reacciones bioquímicas de interés en un sistema de producción vegetal. Una cascada bioquímica es una cadena de reacciones bioquímicas en sistema de producción hospedador que, en última instancia produce un producto, efecto o rasgo específico de interés. Los enfoques descritos en este documento, además de ser versátiles y a prueba de filtración, proporcionan un método de control de producción eficaz. El proceso de dos componentes descrito anteriormente es básicamente un sistema de "llave cerradura" mediante el cual una compañía puede controlar eficazmente el acceso a la producción comercializando el componente de proteína interruptora.

Las plantas preferidas para el uso en esta invención incluyen cualquier especie de planta dando preferencia a especies agrónomicamente y horticulturalmente importante. Las plantas de cultivo comunes para uso en la presente invención incluyen alfalfa, cebada, judías, colza, alubias, algodón, maíz, trébol, loto, lentejas, lupino, mijo, avenas, guisantes, cacahuetes, arroz, centeno, trébol dulce, girasol, guisante dulce, soja, *sorghum triticale*, jícama, fríjol terciopelo, arveja, trigo, glicina y plantas de nuez. Las especies de planta preferidas para la práctica de esta invención incluyen, aunque sin limitación: representantes de *Gramineae*, *Compositae*, *Solanaceae* y *Rosaceae*, donde se prefieren *Solanaceae*.

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

Dentro del alcance de esta invención las especies de plantas, que no se incluyen en la cadena alimenticia o de alimentos, son específicamente preferidas para producción de proteínas farmacéuticas y técnicas. Entre ellas, las especies de *Nicotiana* son las más preferidas, como especies fáciles de transformar y cultivar con sistemas de vectores de expresión bien desarrollados (especialmente vectores virales).

Los genes de interés, sus fragmentos (funcionales y no funcionales) y sus derivados artificiales que se pueden expresar en el proceso celular de interés y aislar usando la presente invención incluyen, pero sin limitación: enzimas modificadoras del almidón (almidón sintetasa, enzima de fosforilación de almidón, enzima desramificadora, enzima ramificadora de almidón, enzima ramificadora de almidón II, sintetasa de almidón unida a gránulo), sacarosa fosfato sintetasa, sacarosa fosforilasa, poligalacturonasa, polifrutano sacarosa, ADP glucosa pirofosforilasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, fructosil transferasa, glicógeno sintetasa, pectin esterasa, aprotinina, avidina, levansacarasa bacteriana, proteína glgA de *E. coli*, MAPK4 y ortólogos, enzima de asimilación/metabolismo de nitrógeno glutamina sintetasa, osmotina de planta, albúmina 2S, taumatina, recombinasa/integrasa específica de sitio (FLP, Cre, recombinasa R, Int, SSVI Integrasa R, Integrasa ϕ C31, o un fragmento activo o variante de los mismos), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de soja), toxina de tipo coleóptera o un fragmento insecticidamente activo, proteínas de fusión de enzima conjugadora de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, superóxido dismutasa, forma de proenzima inactiva de una proteasa, toxinas de proteínas de

plantas, rasgos que alteran la fibra en plantas productoras de fibra, toxina activa de coleóptero de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt2, proteína cristalina insecticida (ICP), toxina CryIC, endotoxina delta, toxina de polio péptido, protoxina, etc.), toxina AaT específica de insecto, enzimas de degradación de celulosa, celulasa E1 de *Acidothermus celluloticus*, enzimas modificadoras de lignina, cinamoil alcohol deshidrogenasa, trehalosa-6-fosfato sintetasa, enzimas de la ruta metabólica de citoquinina, HMG-CoA reductasa, pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, proteína de almacenamiento en semillas, licopeno sintetasa de *Erwinia herbicola*, ACC oxidasa, proteína codificada por pTOM36, fitasa, cetohidrolasa, acetoacetil CoA reductasa, PHB (polihidroxibutanoato) sintetasa, proteína portadora de acilo, napina, EA9, fitoeno sintetasa de plantas no superiores, proteína codificada por pTOM5, ETR (receptor de etileno), piruvato fosfato diquinasas plásticas, proteína de poro transmembrana inducible por nemátodo, función potenciadora de rasgos fotosintéticos o de plástido de la célula vegetal, estilbeno sintetasa, una enzima capaz de hidroxilar fenoles, catecol dioxigenasa, catecol 2,3-dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, antranilato sintetasa, proteína AGL15 de *Brassica*, fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), ARN3 de AMV, PVY replicasa, PLRV replicasa, proteína de cubierta de potyvirus, proteína de cubierta de CMV, proteína de cubierta de TMV, replicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa geminiviral mutante, acil-ACP tioesterasa preferida de *Umbellularia californica* C12:0, acil-ACP tioesterasa preferida de planta C10 o C12:0, acil-ACP tioesterasa preferida C14:0 (luxD), factor A de sintetasa vegetal, factor B de sintetasa vegetal, D6-desaturasa, proteína que tiene una actividad enzimática en la β -oxidación peroxisómica de ácidos grasos en células vegetales, acil-CoA oxidasa, 3-cetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA-carboxilasa de maíz, 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintetasa (EPSP), fosfinotricina acetil transferasa (BAR, PAT), proteína CP4, desaminasa ACC, proteína que tiene sitio de escisión postraducciona, gen de DHPS que confiere resistencia a sulfonamida, nitrilasa bacteriana, 2,4-D monooxigenasa, acetolactato sintetasa o acetohidroxi ácido sintetasa (ALS, AHAS), poligalacturonasa, Taq polimerasa, nitrilasa bacteriana, muchas otras enzimas de bacterias o fagos que incluyen endonucleasas de restricción, metilasas, ADN y ARN ligasas, ADN y ARN polimerasas, transcriptasas inversas, nucleasas (ADNasa y ARNasas), fosfatasa, transferasas etc.

La invención también se puede usar, con el propósito de cultivo y purificación molecular de proteínas valiosas comercialmente y farmacéuticamente importantes incluyendo enzimas industriales (celulasas, lipasas, proteasas, fitasas, etc.), y proteínas fibrosas (Colágeno, proteína de seda de araña, etc.). Cualquier proteína sana humana o animal se puede expresar y purificar usando el enfoque descrito en esta invención. Los ejemplos de tales proteínas de interés incluyen, entre otros proteínas de respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, receptores de células T, etc.), antígenos incluyendo aquellos obtenidos a partir de microorganismo patógenos, factores de estimulación de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas incluyendo somatotropina (HGH) y proinsulina, citoquinas y sus receptores, interferones, factores del crecimiento y factores de coagulación, enzima lisosomal enzimáticamente activa, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación sanguínea, tripsinógeno, α 1-antitripsina (AAT), albúmina sérica humana, glucocerebrosidasas, toxina B de cólera nativa así como proteínas de conservación de función tales como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas anteriores.

Ejemplo 1

Uso de recombinación de ADN específica de sitio desencadenada por proteína interruptora para ensamblar un vector de amplificación a partir de partes de provector integradas de forma estable en el genoma vegetal.

El vector binario piCHFPinv (Figura 7) que porta ADN-T con dos partes de provector se ha diseñado usando técnicas de biología molecular convencionales (Maniatis *et al.*, 1982, Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Las descripciones de elementos de provector y principios básicos de su construcción en funcionamiento se describen con detalle en la solicitud de patente PCT/EP02/03476 (WO02088369) y en el documento DE 101 21 283. El vector porta marcador de transformación (gen NPTII), el extremo 5' de TMV precedido por el promotor vegetal del gen de actina 2 de *Arabidopsis* (An *et al.*, 1996, Plant J., 10, 107-121) y contiene una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y proteína de movimiento (MP) seguido por un promotor subgenómico. El vector también contiene el extremo 3' del provector que contiene un gen de interés (GFP), proteína de cubierta viral (CP) que proporciona el movimiento sistémico y la región 3' no traducida del vector viral (3'NTR). El provector 3' junto con dos señales de terminación de transcripción está flanqueado por sitios de recombinación reconocidos por integrasa de fago phiC31 (Thomason, Calendar & Ow, 2001, Mol. Genet. Genomics, 265, 1031-1038).

Plantas de *Nicotiana benthamiana* transgénicas que contiene ADN-T de piCHGFPinv se obtuvieron mediante transformación mediada por *Agrobacterium* de discos de hoja como se ha descrito por Horsch *et al.*, (1985, Science, 227, 129-131). Los discos de hoja se incubaron durante 30 min con cepa GV3101 de *Agrobacterium* transformada con la construcción de interés. Después de 3 días de incubación en medio (medio MS 0,1 mg/l de NAA, 1 mg/l de BAP) sin agente selectivo, se realizó selección de transformantes en el mismo medio MS complementado con 100 mg/l de kanamicina. Para reducir el crecimiento de *Agrobacterium*, el medio también se complementó con 300 mg/l de carbenicilina y 300 mg/l de cefotaxima. Se incubaron los regenerantes en medio MS selectivos sin hormonas complementado con la misma concentración de los agentes selectivos para inducir la formación de raíces. La presencia del transgen en poblaciones de T2 separadas se confirmó mediante análisis de PCR.

Para producir una integrasa o recombinasa permeable a célula fusionada a la señal de translocación de membrana (MTS) de elección, el conjunto de construcciones para el sistema de provector (documento WO02088369) se preparó (véase la Figura 9) de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales. La integrasa phiC31 se produjo en

ES 2 337 895 T3

hojas de *N. benthamiana*, dicha integrasa se fusionó a MTS de HIV-Tat48-60 (Wender *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 13003-13008) o MTS de Factor de Crecimiento Fibroblastos de Kaposi (FGF) MTS (Lin *et al.*, 1995, J. Biol. Chem., 270, 14255-14258). El extracto de proteína crudo a partir de hojas de *N. benthamiana* infectadas se usó para tratamiento de plantas transgénicas transformadas con ADN-T de pICHGFP_{inv}. Para facilitar la penetración de la pared celular vegetal, se usó una adición de enzimas celulíticas a extracto de proteína cruda que contenía la integrasa en algunos experimentos. Se usó la celulasa Onozuka R-10 (Serva) al 0,001% para aumentar la eficacia de la administración de la fusión MTS-integrasa en la célula vegetal.

La exposición de hojas de plantas transgénicas a integrasa permeable a célula provocan recombinación específica de sitio entre los sitios attP y attB. Tal recombinación conduce a la inversión del provector 3', creando de ese modo un ADNc completo de un amplicón viral bajo el control del promotor de actina 2 (Figura 7, B). El amplicón de ARN basado en TMV que expresa GFP es con capacidad de movimiento de célula a célula y sistémico. La expresión de GFP en plantas de *N. benthamiana* se puede detectar fácilmente usando una lámpara UV o analizando el tejido vegetal bajo un sistema de microscopio fluorescente estéreo LEICA (excitación a 450-490 nm, emisión a 500-550 nm). Los GFP usados en los experimentos se pueden excitar mediante luz azul y UV.

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar una planta modificada genéticamente, que comprende:

- (a) proporcionar una planta modificada genéticamente donde las células de dicha planta modificada genéticamente contienen un ácido nucleico heterólogo y donde dicha planta modificada genéticamente es inactiva con respecto a un proceso celular de interés,

donde dicho proceso celular de interés comprende la formación de un amplicón de ARN expresable a partir de dicho ácido nucleico heterólogo;

donde, en dicho ácido nucleico heterólogo, la secuencia que codifica el amplicón de ARN está separada de un promotor mediante un bloque de secuencia que impide una unión operativa entre el promotor y la secuencia que codifica el amplicón de ARN; estando dicho bloque de secuencia flanqueado por sitios de recombinación de forma que dicho bloque se puede cortar mediante una recombinasa que reconozca dichos sitios de recombinación; y

- (b) activar dicho proceso celular de interés introduciendo directamente un polipéptido a partir de una composición sin células en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo; comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de translocación de membrana unida covalentemente que posibilita la introducción directa de dicho polipéptido en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo; y teniendo dicho polipéptido una actividad enzimática de una recombinasa específica de sitio que reconoce dichos sitios de recombinación de forma que dicho bloque se pueda cortar, estableciendo de ese modo una unión operativa para la transcripción de la secuencia que codifica el amplicón de ARN.

2. Un método para controlar una planta modificada genéticamente que comprende:

- (a) proporcionar una planta modificada genéticamente donde las células de dicha planta modificada genéticamente contienen un ácido nucleico heterólogo y donde dicha planta modificada genéticamente es inactiva con respecto a un proceso celular de interés,

donde dicho proceso celular de interés comprende la formación de un amplicón de ARN expresable a partir de dicho ácido nucleico; teniendo dicho ácido nucleico heterólogo una porción de secuencia necesaria para transcripción de amplicón de ARN en orientación invertida y flanqueada por sitios de recombinación, donde la porción de secuencia se puede unir operativamente a un promotor de transcripción mediante una recombinasa;

- (b) activar dicho proceso celular de interés introduciendo directamente un polipéptido a partir de una composición sin células en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo; comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de translocación de membrana unida covalentemente que posibilita la introducción directa de dicho polipéptido en células que contienen dicho ácido nucleico heterólogo; y teniendo dicho polipéptido una actividad enzimática de una recombinasa específica de sitio que invierte dicha porción de secuencia en orientación correcta, uniéndose de forma operativa de ese modo una secuencia que codifica el amplicón de ARN con dicho promotor.

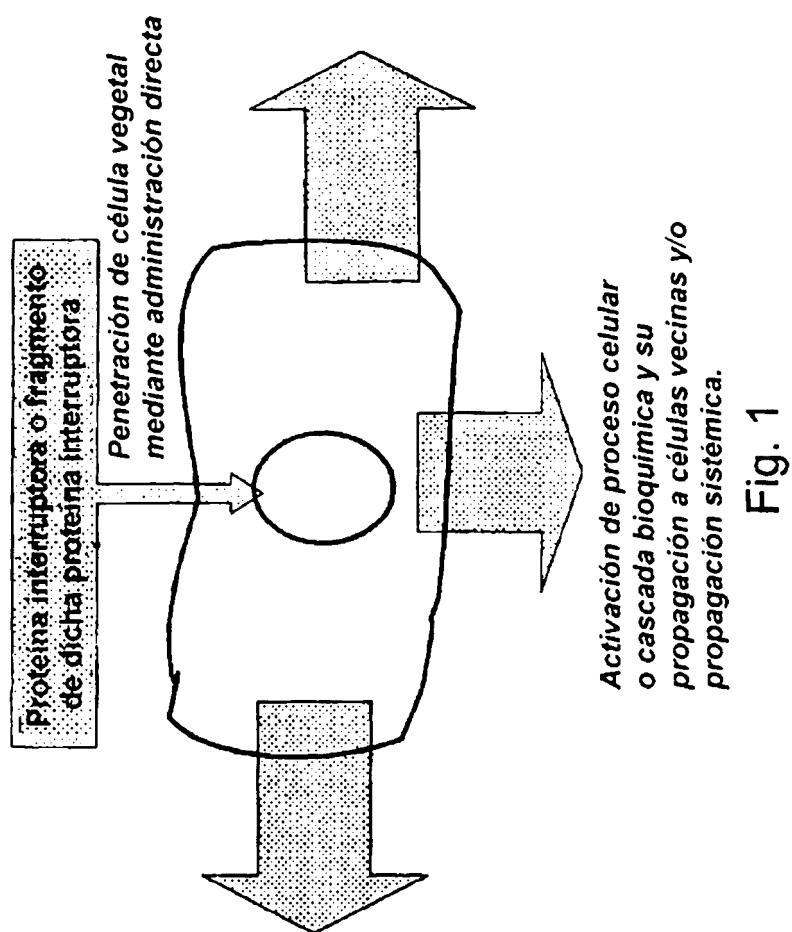
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde dicha activación de dicho proceso celular de interés comprende la formación de una proteína a partir de dicho ácido nucleico heterólogo.

4. El método de la reivindicación 3, donde dicha proteína es capaz de propagarse a otras células de dicha planta, comprendiendo dicha proteína una porción de proteína que dota a dicha proteína con la capacidad de dejar una célula y entrar en otras células de dicha planta, en el que dicha porción de proteína se selecciona entre el siguiente grupo: una proteína de movimiento viral, proteína de cubierta viral, factor de transcripción vegetal o animal y mensajero intercelular peptídico vegetal o animal.

5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho amplicón expresable tiene capacidad de movimiento de célula a célula o sistémico en dicha planta.

6. El método de una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha planta es una planta transgénica que contiene dicho ácido nucleico heterólogo integrado de forma estable en el genoma nuclear.

7. El método de una de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicha planta es una planta transgénica que contiene dicho ácido nucleico heterólogo integrado de forma estable en el genoma del plástido.



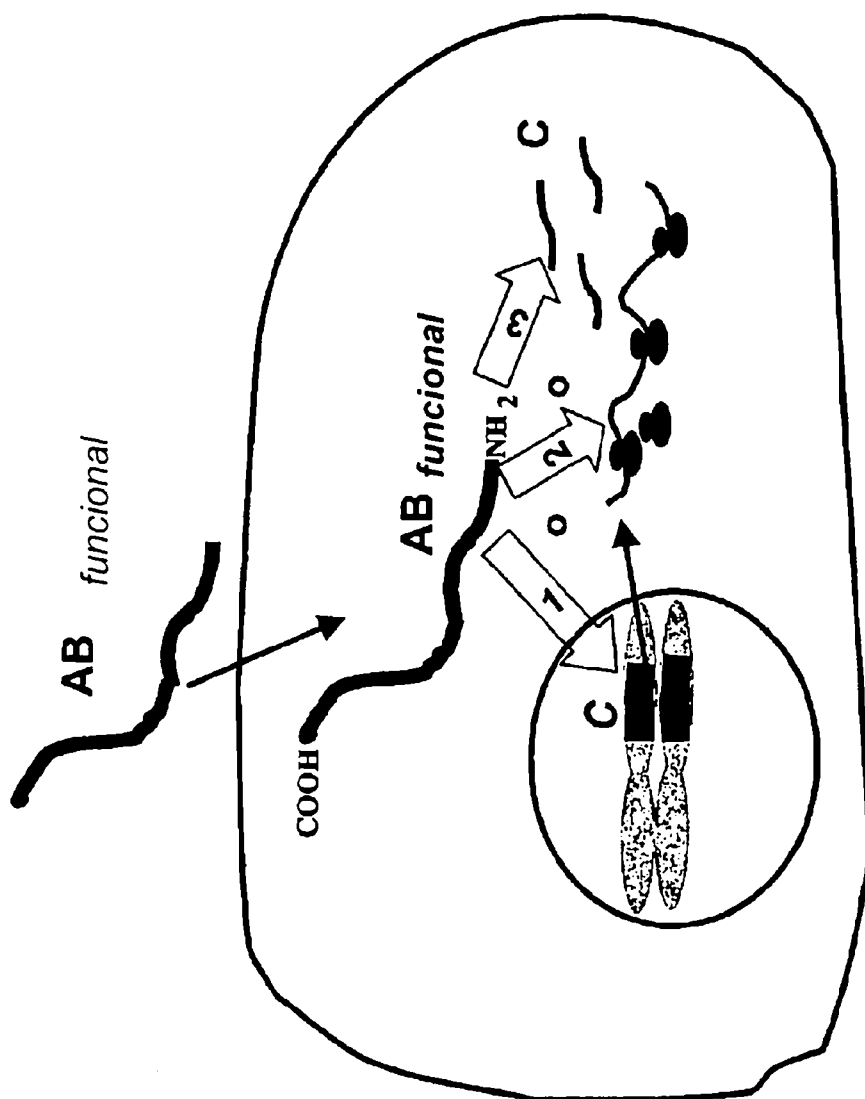


Fig. 2

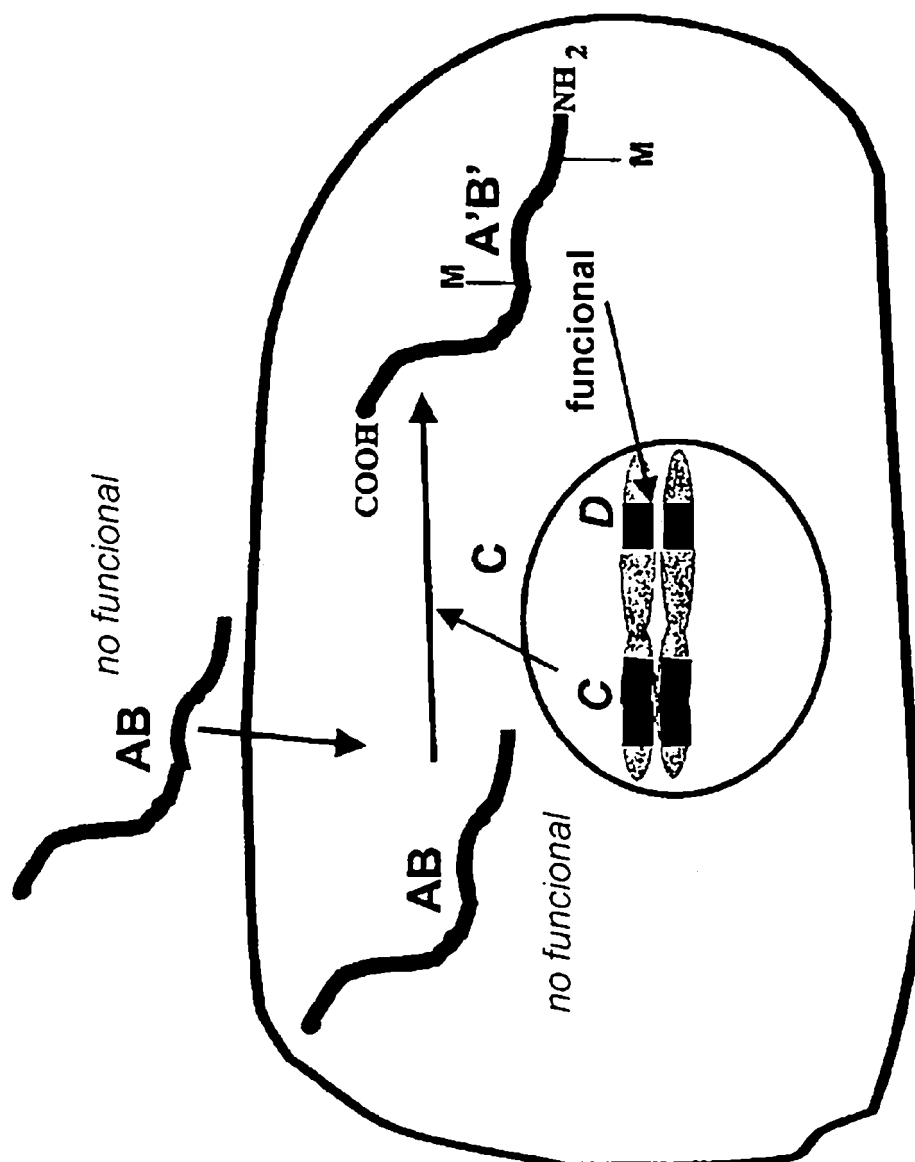
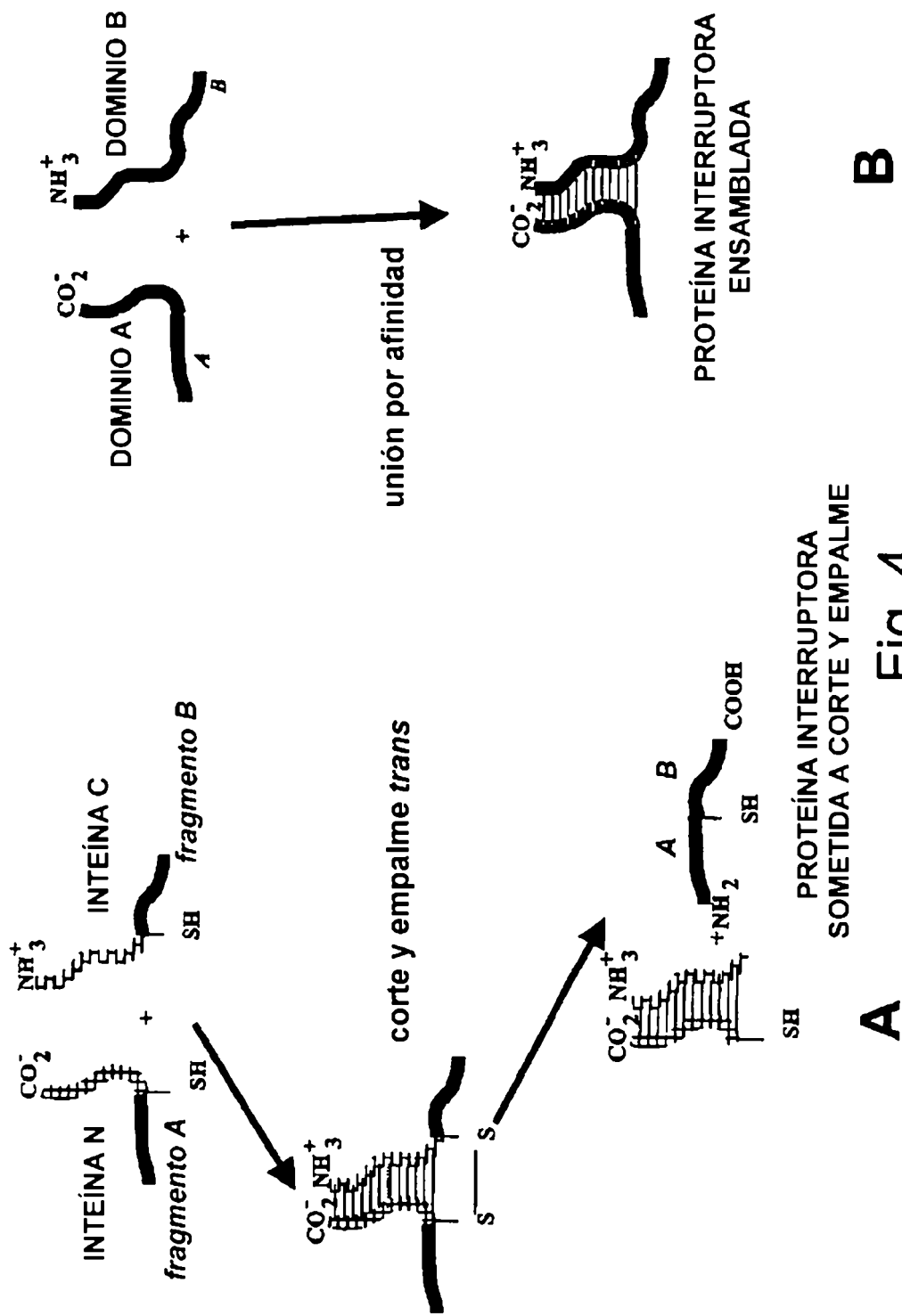
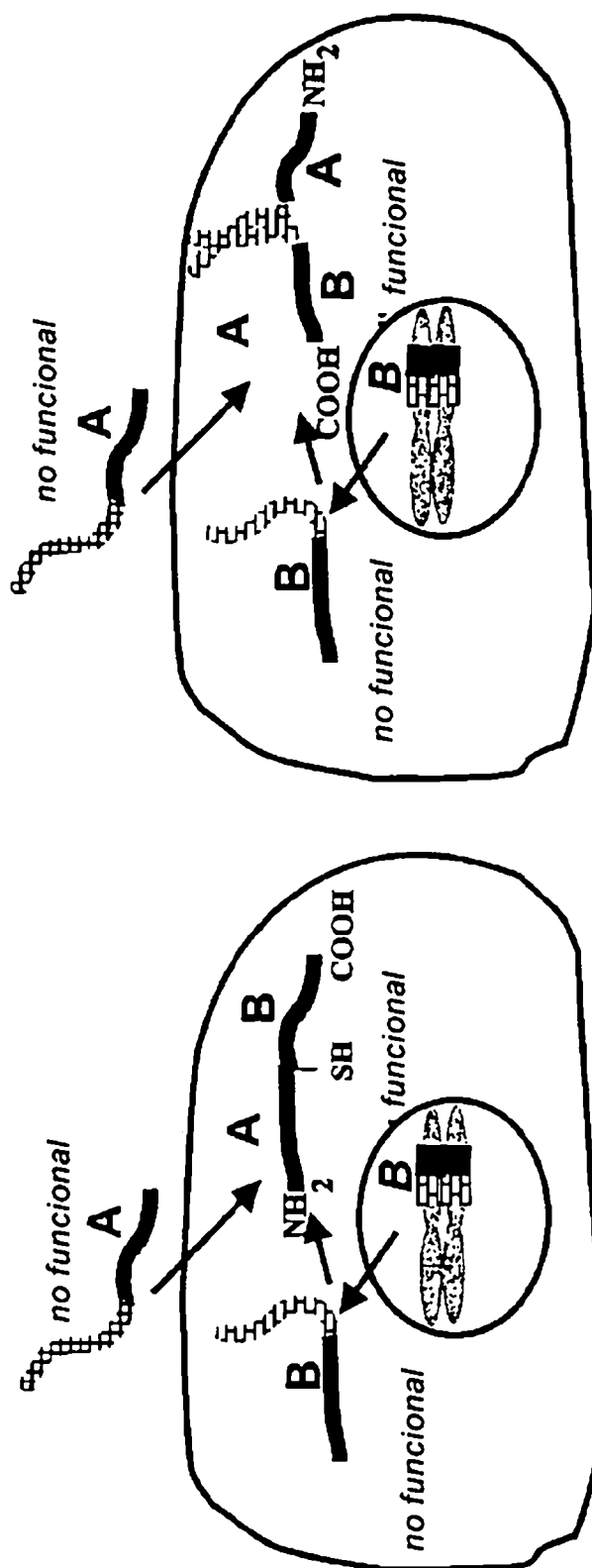


Fig. 3



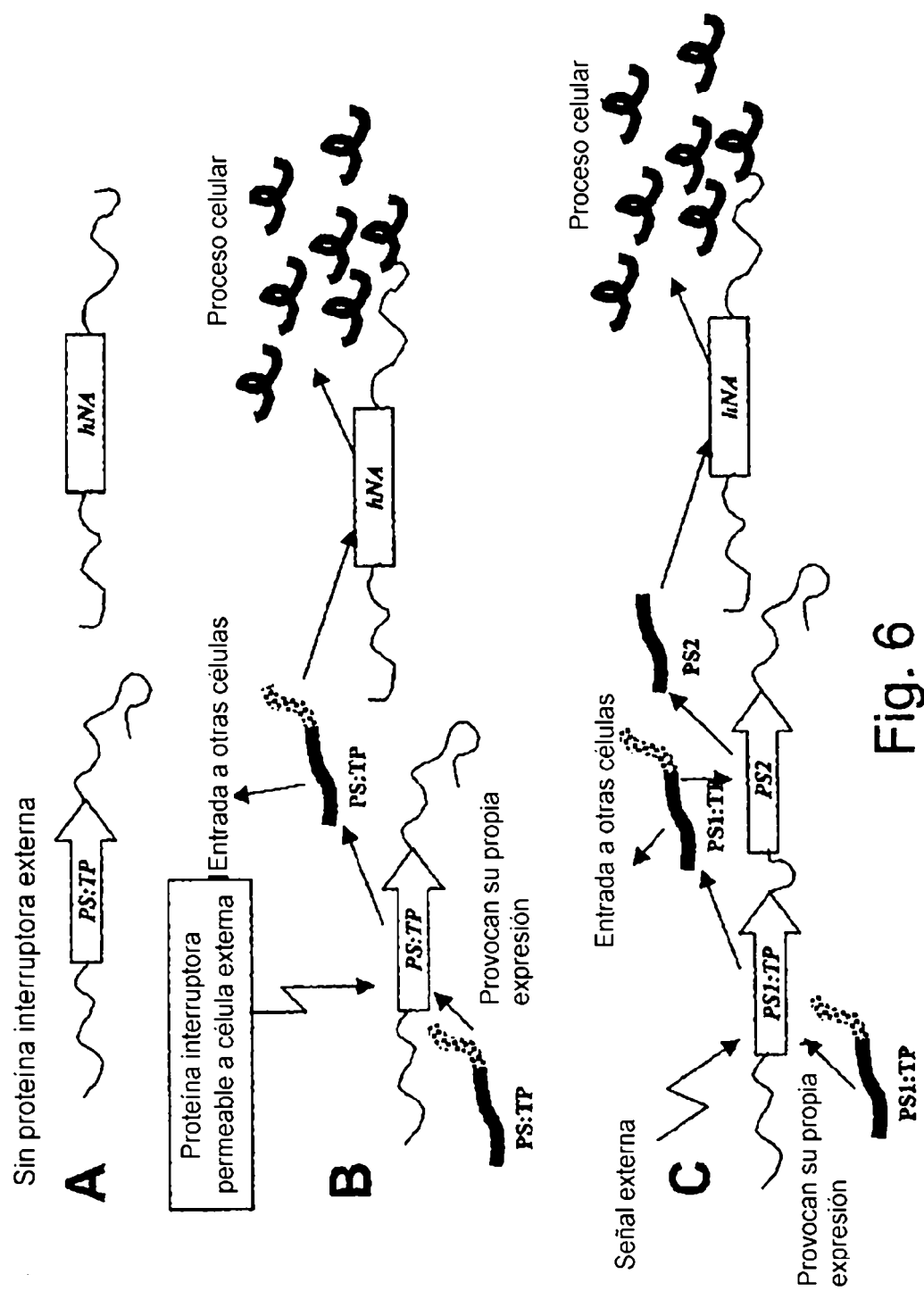
A **Fig. 4**



B

Fig. 5

A



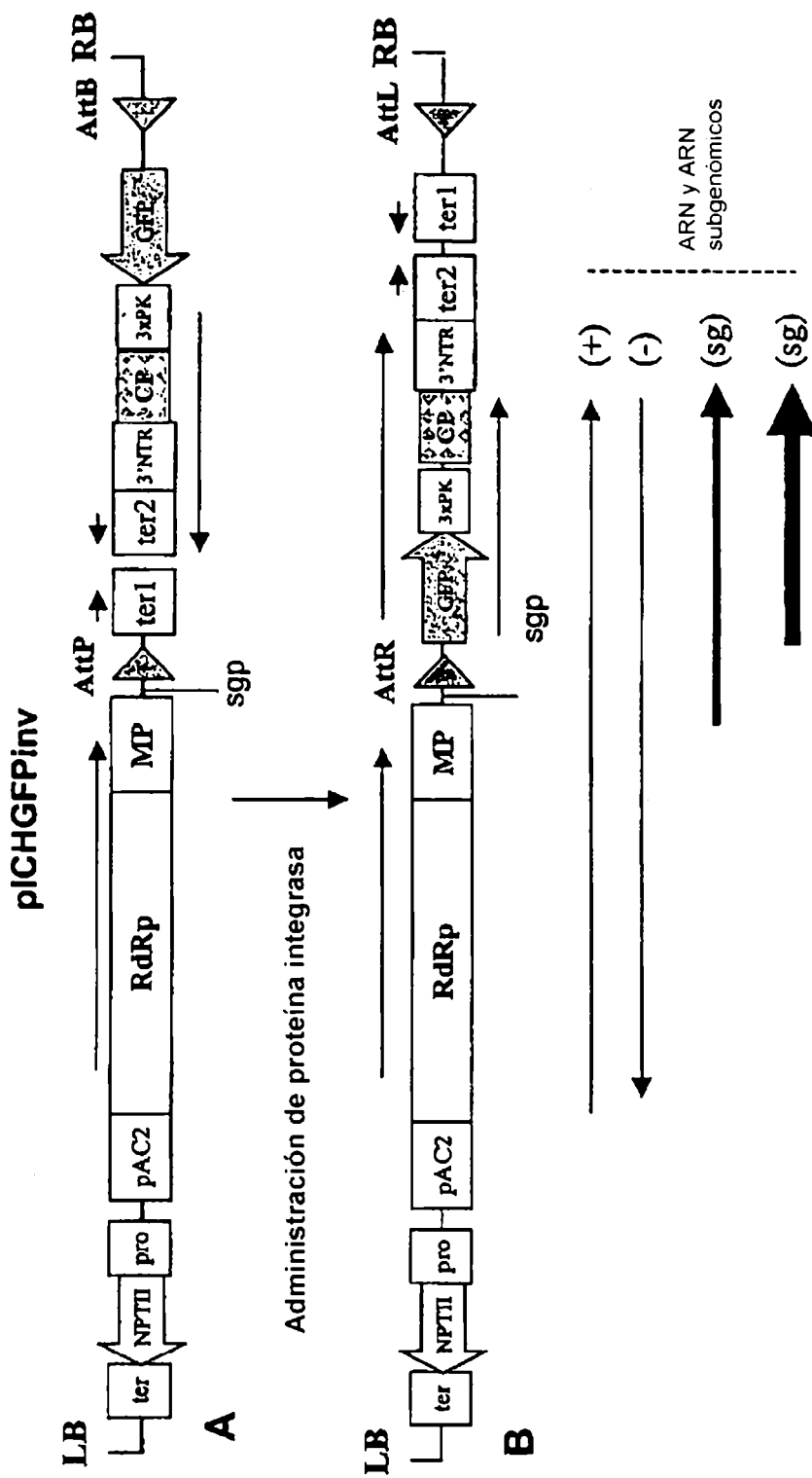


Fig. 7

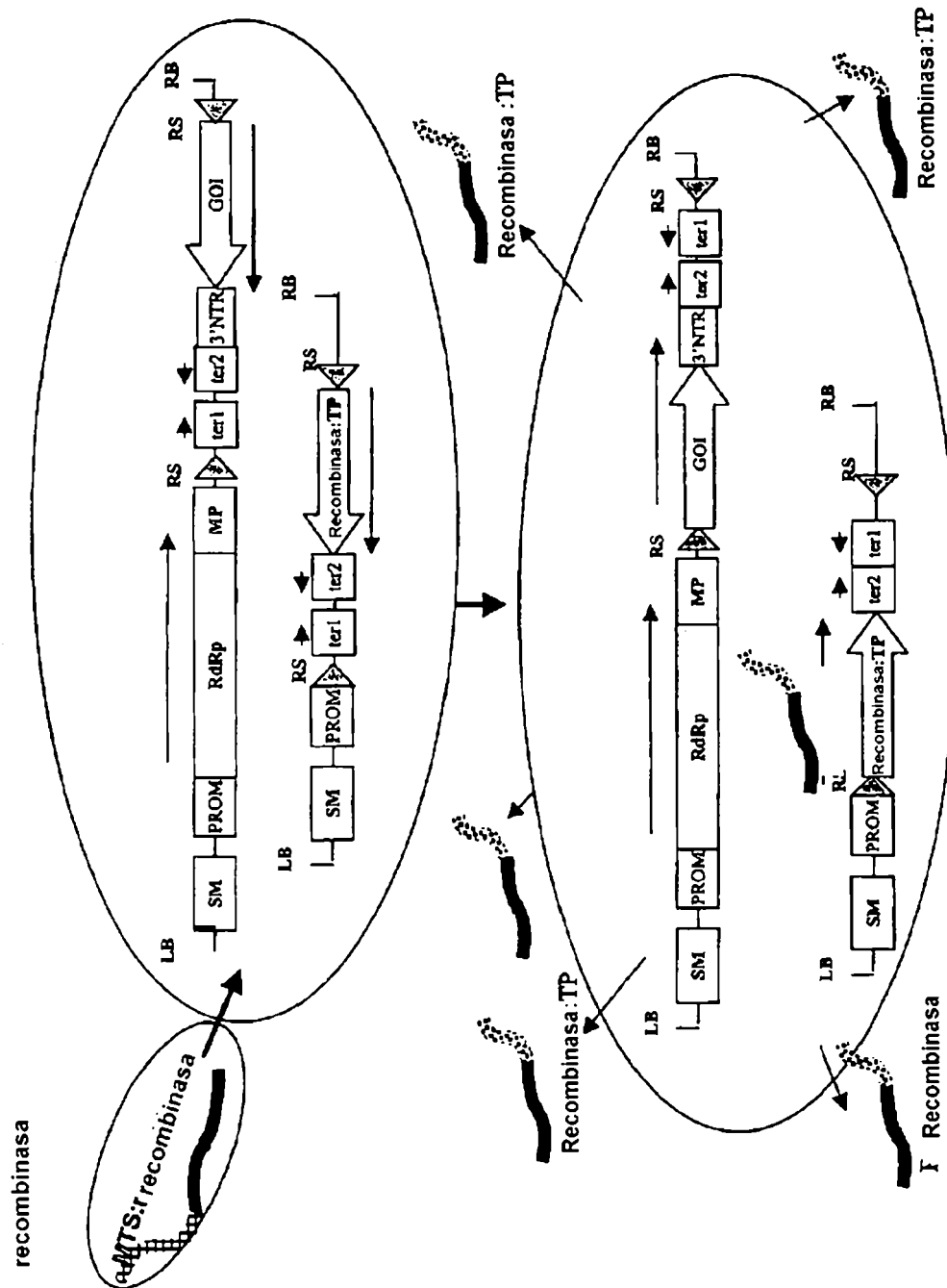


Fig. 8

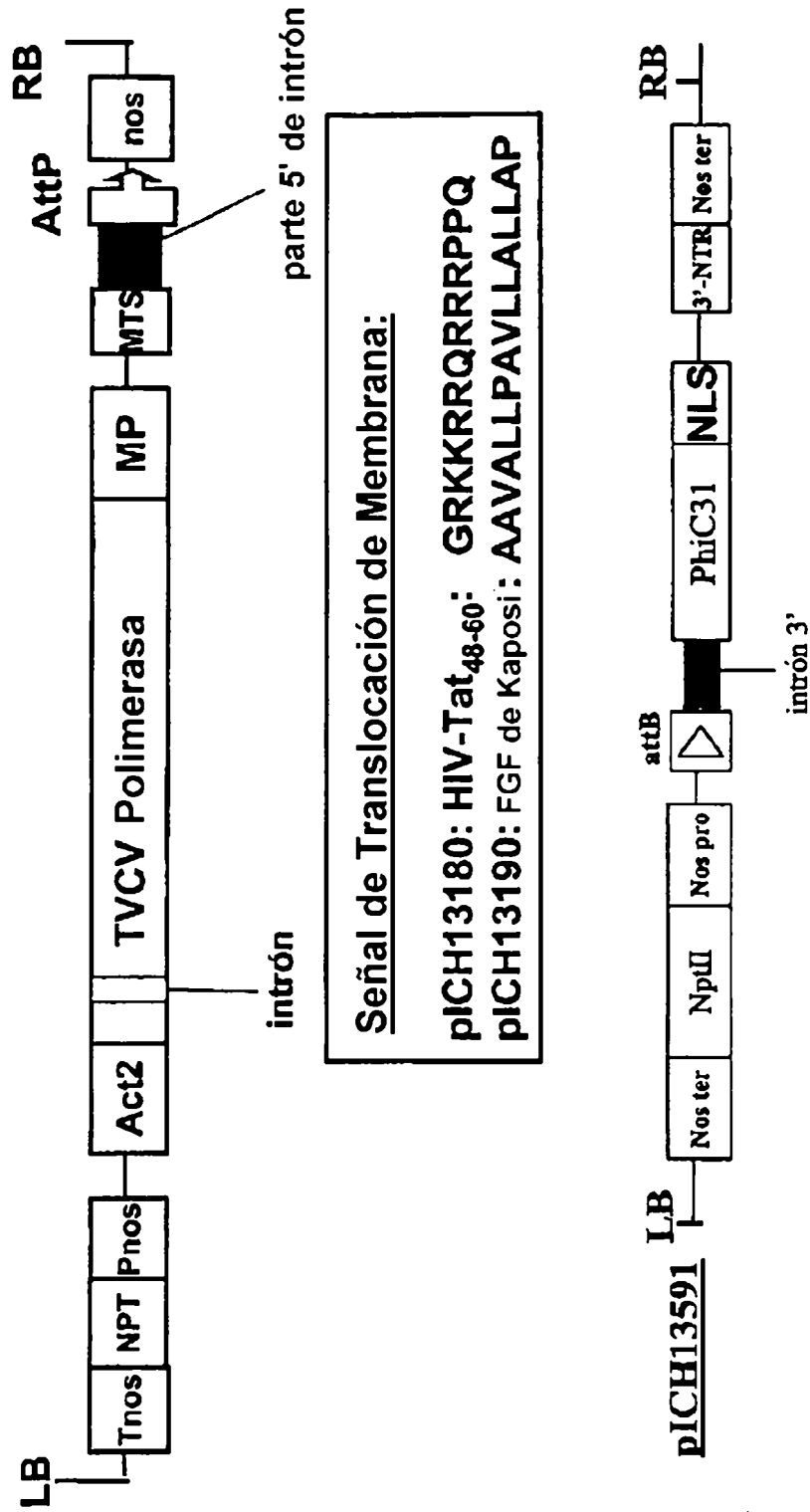


Fig. 9