

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
28 de enero de 2010 (28.01.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/010207 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/29 (2006.01) A01H 15/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000375

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de julio de 2009 (17.07.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802207 24 de julio de 2008 (24.07.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN EN GENÓMICA Y PROTEÓMICA [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): ORZAEZ CALATAYUD, Diego [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES). HUESO ESTORNELL, Leandro [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES). PINEDA CHAZA, Benito [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES). ANTÓN MARTÍNEZ, Teresa [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES). MORENO FERRERO, Vicente [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES). GRANELL RICHART, Antonio [ES/ES]; C/ Orense, 69 - 2ª planta, 28020 Madrid (ES).

(74) Mandatario: ARIZTI ACHA, Mónica; C/ Hermosilla 3, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: CONSTITUTIVE PROMOTER OF *SOLANUM LYCOPERSICUM*

(54) Título: PROMOTOR CONSTITUTIVO DE *SOLANUM LYCOPERSICUM*

(57) Abstract: The invention relates to a promoter sequence (SEQ. ID. N0:2) derived from a gene of *Solanum lycopersicum*, of an unknown function and denominated CNH1. The invention relates to nucleotidic constructions, vectors, cells of plants and transgenic plants comprising the promoter of the invention, and the seeds thereof. The constitutive promoter according to the invention can be used for the sense, miRNA, antisense or RNAi gene expressions of the DNA sequences with which it merges, in all of the organs of the plant, with especially high levels in fruit. The promoter is especially interesting when expression levels similar to those obtained by the promoter CaMV 35S are desired in the fruit over different stages of its development, but not at such a high level in the rest of the plant, especially in *Solanaceae/Solanum*, enabling the use of heterologous promoters to be avoided.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una secuencia promotora (SEQ. ID. N0:2), derivada de un gen de *Solanum lycopersicum*, de función desconocida y denominado CNH1. La invención está dirigida a las construcciones nucleotídicas, vectores, células de plantas y plantas transgénicas que comprenden el promotor de la invención, así como a sus semillas. El promotor constitutivo de la invención es útil para la expresión génica sentido, miRNA, antisentido o RNAi de las secuencias de DNA a las que se fusiona, en todos los órganos de la planta, con niveles especialmente elevados en el fruto. El promotor es de especial interés cuando niveles de expresión similares a los obtenidos por el promotor CaMV 35S son deseados en el fruto durante diferentes estadios de su desarrollo, pero no de forma tan elevada en el resto de la planta, especialmente dentro de *Solanaceae/Solanum*, permitiendo evitar el empleo de promotores heterólogos.

WO 2010/010207 A1

PROMOTOR CONSTITUTIVO DE *Solanum lycopersicum*

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una secuencia del promotor CNH1 (SEQ. ID. NO:2) derivada de un gen de tomate *Solanum lycopersicum* con función desconocida, denominado CNH1 –de *Constitutive No Hits number 1*. La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico, vectores, células de plantas y plantas transgénicas que comprenden el promotor así como a las semillas de las mismas. El promotor es de utilidad cuando se fusiona a secuencias de DNA apropiadas para dirigir la expresión génica sentido, miRNA, antisentido o RNAi en todos los órganos de la planta y especialmente con niveles altos en el fruto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los promotores son elementos reguladores que dirigen la expresión de genes. Tanto los promotores constitutivos como los reguladores se usan para dirigir la expresión génica en organismos transgénicos incluyendo plantas.

Los promotores constitutivos dirigen la expresión en la mayoría o en todos los tejidos, y son de utilidad cuando niveles altos de producción de un producto génico son deseados en toda la planta. El promotor 35S de virus del mosaico de la coliflor (VMC) es el promotor que se usa más frecuentemente para dirigir niveles altos de expresión constitutiva en plantas.

Los promotores reguladores, tales como promotores inducibles y específicos de tejido, se usan para dirigir la expresión espacial o temporalmente específica o la expresión en respuesta a factores ambientales.

Con respecto a promotores constitutivos, de lejos el promotor CaMV35S es el promotor usado más frecuentemente en biotecnología de plantas (US Food and Drug Administration for Food Safety and Nutrition, <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html>). Diferentes versiones derivadas de este promotor (incluyendo las sintéticas) han sido empleadas (Fang, R.X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S. y Chua, N.H. 1989. *Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants*. Plant Cell 1: 141–150; patente US Patent 6072050; patente US Patent 6555673). Se ha demostrado que este promotor es de utilidad para dirigir buenos niveles de expresión cuando es clonado frente a un gen de interés, en casi todas las plantas dicotiledóneas en las que ha sido testado (incluyendo *Arabidopsis thaliana*,

Nicotiana tabacum, *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays* y *Oryza sativa*, etc.) (US Food and Drug Administration for Food Safety and Nutrition, (<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html>)). En monocotiledóneas/gimnospermas este promotor 35S no ha sido ampliamente usado, y la preferencia es para el promotor ubiquitina 1 de maíz (Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH(1992) *Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*. Plant Mol. Biol 18: 675, 689) o el "superpromotor" (Ni M, Cui D, Einstein J, Narasimhulu S, Vergara C, Gelvin S (1995) *Strength and Tissue specificity of chimeric promoters derived from octopine and mannopine synthase genes*. Plant J 7, 651-676). Se han descrito otros promotores en plantas para conferir niveles moderados de expresión constitutiva, pero no han sido ampliamente usados. Este es el caso del promotor CmYLCV (*Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops*, Stavolone *et al.* (2003) Plant molecular biology 53, pp. 663-673) y del promotor constitutivo de tabaco en patente US Patent 5824872, entre otros.

En el género *Solanum* (incluye tomate, patata, pimiento, tabaco, etc.) casi todas las expresiones llevadas a cabo bajo promotores constitutivos hicieron uso del promotor CaMV35S. En algunos casos puede ser deseable diseñar mediante ingeniería una secuencia de DNA o un gen de interés sometido a un promotor que se expresa en menor nivel en los tejidos vegetativos de modo que no compromete el crecimiento de la planta, siendo el promotor capaz de dirigir niveles altos de expresión en el fruto para producir la modificación deseada en este órgano (es decir afectando a las características del fruto o acumulación de una proteína extraña). También han sido descritos promotores específicos de fruto de tomate, tal como E8 (Nicholass *et al*, 1995), PG (Bañaren *et al*, 1991), 2A11 (Deikman *et al*, 1992), que dirigen la expresión génica en el fruto. Sin embargo funcionan de modo preferencial durante el desarrollo tardío del fruto, especialmente durante la maduración, y por tanto no cubren los estadios de desarrollo del fruto restantes en los que dirigir la expresión de un gen recombinante podría ser deseable.

Por tanto, la identificación de un promotor alternativo que preferentemente confiera altos niveles de expresión en el fruto durante diferentes estadios de desarrollo, pero con un nivel de expresión menor en los tejidos vegetativos es altamente deseable.

Casos especiales son los promotores obtenidos a partir de las mismas especies que van a ser modificadas o de especies sexualmente compatibles. Esto resulta particularmente importante cuando se desea un enfoque de "cisgenesis" o "intragensis" en vez de un enfoque transgénico. Por "Cisgenesis" se entiende una modificación genética (= GM; normalmente mediante técnicas de DNA recombinante) de plantas con una secuencia de DNA o gen de la misma planta de cultivo que va a ser transformada o de plantas donadoras sexualmente compatibles que pueden usarse en el cultivo de plantas tradicionales. En la práctica, se restringe a genes que codifican para características heredadas de modo dominante. El gen pertenece al conjunto de genes del cultivador. La planta modificada genéticamente con cisgenes es una planta cisgénica (*Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. Schouten, H.J., Krens, F.A., Jacobsen, E., 2006. EMBO Reports 7: 750-753; "Cisgenic" as a product designation, Schubert D & Williams D. 2006. Nature Biotechnology 24: 1327-1329.* A diferencia de un transgén, que se define como un gen o secuencia de DNA de especies no sexualmente compatible o una secuencia de DNA o gen sintético. La planta modificada genéticamente correspondiente que contiene transgenes es una planta transgénica.

Por tanto, la identificación de un promotor constitutivo de tomate que preferiblemente funcione en el fruto en diferentes estadios de su desarrollo es altamente deseable ya que facilitaría enfoques cis o intragénicos eficientes. Esto resultaría especialmente interesante cuando se requieren niveles altos de expresión en el fruto en estadios de desarrollo diferentes de la maduración.

El promotor descrito en el presente documento puede ser usado en todas las especies de plantas como alternativa a CaMV35S pero es de especial aplicación en el género *Solanum* para conferir expresión constitutiva de genes o secuencias de DNA de interés con niveles particularmente altos en el fruto, en todos los estadios de desarrollo. En el caso de cisgenesis o intragenesis, cualquier característica deseada debido a un alelo dominante disponible en el conjunto génico en las especies sexualmente compatibles puede ser aislada, posteriormente sometida al control del promotor CNH y ser introducida en tomate o especies relacionadas para conferir la característica de interés.

La presente invención proporciona un promotor que dirige niveles altos de expresión de genes o secuencias de DNA en plantas, especialmente altos en el fruto. Este promotor deriva de un gen de función desconocida de *Solanum lycopersicum* que se expresa de modo ubicuo en toda la planta. Este promotor de tomate puede ser de

especial interés para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés de especies relacionadas dentro de *Solanaceae* / *Solanum* (el tomate pertenece a este género) de modo que pueden lograrse niveles altos de expresión (similares a CaMV35S en el fruto) sin necesidad de usar promotores heterólogos y por tanto es de interés para
5 la introducción dirigida de genes” dentro de *Solanaceae/Solanum* usando una estrategia en la que todas las secuencias son de *Solanaceae/Solanum*”.

Adicionalmente, según la presente invención, el promotor de la invención, derivado de CNH1, puede dirigir niveles altos de expresión constitutiva de secuencias de DNA o genes heterólogos en plantas, especialmente cuando los niveles más altos son
10 deseados en el fruto. El promotor de la presente invención es de utilidad cuando niveles de expresión similares a los obtenidos por el promotor CaMV 35S son deseados en el fruto durante diferentes estadios de su desarrollo, pero no de forma tan elevada en el resto de la planta.

OBJETO DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a un promotor aislado derivado de un gen de tomate *Solanum lycopersicum* con función desconocida. En una realización particular este gen es el gen CNH. En otra realización particular, el promotor presenta al menos el 70% de identidad con la secuencia de SEQ. ID. NO:2. Este promotor es de especial utilidad fusionado a secuencias de DNA apropiadas, para dirigir la expresión génica
20 constitutiva sentido, miRNA, antisentido o RNAi en la mayoría de los tejidos de plantas principales durante todos sus ciclos de vida, pero con niveles especialmente altos en el fruto.

Este promotor de tomate puede ser de especial interés para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés de especies relacionadas dentro de la especie
25 *Solanaceae* / *Solanum* a la que pertenece el tomate, pudiendo obtenerse altos niveles de expresión (similares a los obtenidos en el fruto a través del promotor CaMV35S, pero menores a los obtenidos a través del mismo en el resto de tejidos de la planta), sin la necesidad de emplear promotores heterólogos. Es decir, el promotor de la invención presenta interés en la producción de “targeted introgression of genes” en
30 *Solanaceae/Solanum* empleando “the all *Solanaceae/Solanum* strategy”.

Adicionalmente, el promotor de la invención derivado de CN1H, permite la expresión en plantas, con preferencia en el fruto, no sólo de genes o secuencias de DNA endógenas sino también de genes heterólogos o secuencias de DNA, en orientación

sentido o antisentido, para conseguir sobreexpresión o silenciamiento de la expresión de dichos genes. Estos genes pueden ser genes o secuencias de DNA de plantas, específicos del fruto, o genes o secuencias heterólogas cuya expresión se desea en el fruto.

- 5 El promotor CNH1 de la invención es efectivo en la planta *Tomato lycopersicum* de la cual deriva, en otras especies del género *Solanaceae / Solanum*, así como en otras plantas que presentan frutos.

Así, el promotor de la invención es ideal para aplicaciones en las que una expresión ubicua de un gen o una secuencia de DNA (endógenos o heterólogos) es
10 deseada en la planta, pero con niveles más altos en el fruto, cuando niveles de expresión similares a los obtenidos por el promotor CaMV35S son deseados en el fruto pero no de forma tan elevada en el resto de la planta, y cuando más de un promotor constitutivo es necesario para expresar dos o más proteínas recombinantes en una planta de forma concertada y preferentemente en el fruto

- 15 El promotor de la invención es útil en estrategias del tipo “plantas biofactoría” en las que el fruto se utiliza como plataforma para la producción recombinante de proteínas que albergan por sí mismas actividad biológica o terapéutica al ser administradas por vía oral, o que regulan o catalizan la producción de otros compuestos metabólicos con actividad biológica o terapéutica por vía oral (vacunas orales, tolerógenos, biocidas,
20 anticuerpos neutralizantes, adyuvantes, compuestos antioxidantes, vitaminas, aromas, suplementos dietéticos); en la producción de complejos multiproteicos que requieran expresar de forma concertada dos o más genes con distintos promotores constitutivos para evitar reordenaciones génicas y/o procesos de silenciamiento génico; en la adquisición de fenotipos de resistencia a patógenos, para la modificación de la
25 arquitectura del fruto otorgando a la planta y al fruto distintas propiedades en función del gen o secuencia nucleotídica que se exprese bajo su control.

1. Promotor es un elemento regulador que dirige la expresión de genes.

- 2. Promotor constitutivo** se refiere a aquellos promotores que dirigen expresión en la mayoría o todos los tejidos y son de utilidad cuando niveles altos de producción de
30 un producto génico son deseados en toda la planta.

3. Promotores regulados, promotores específicos de tejido e inducibles, son aquellos empleados para dirigir la expresión específica espacial o temporalmente, o la expresión en respuesta a factores ambientales.

4. Genes y secuencias de DNA de interés se refiere a aquellos genes y
5 secuencias que codifican para péptidos de interés que pueden ser usados junto con el promotor CNH1 de la invención. Se refieren a secuencias y genes de plantas de *Solanum lycopersicum*, de plantas del género *Solanum* o cualquier gen o secuencia heterólogos, o sintéticos. Dichos genes y secuencias incluyen, pero no se limitan a genes implicados en la modificación de la maduración; genes implicados en conferir resistencia a hongos;
10 genes relacionados con patogénesis de plantas; genes implicados en conferir resistencia frente a insectos; genes que son efectivos en la modulación de la floración, aroma, modificación de color, enzimas u otros productos catalíticos (tales como: ribozimas o anticuerpos catalíticos que modifican procesos celulares en plantas), producción de etileno (tal como: moléculas antisentido, enzimas que degradan precursores de la
15 biosíntesis de etileno, productos catalíticos o moléculas de silenciamiento), genes para el control de hongos, producción o niveles de hormonas de planta, el ciclo celular o la división celular, y acumulación de sacarosa (tal como el gen de la sacarosa fosfato sintasa). Genes y secuencias de interés se refiere también a aquellos genes y secuencias que codifican para péptidos o proteínas que pueden ser usados en "molecular pharming"
20 para la producción recombinante de proteínas que albergan por sí mismas actividad biológica o terapéutica o que regulan o catalizan la producción de otros compuestos metabólicos con actividad biológica o terapéutica (vacunas orales, tolerógenos, biocidas, anticuerpos neutralizantes, adyuvantes, compuestos antioxidantes, vitaminas, aromas, suplementos dietéticos).

25 **5. Gen o Secuencia Heteróloga:** Gen o secuencia nucleotídica de origen sintético u obtenido del genoma de animales o vegetales de género distinto a *Solanum*.

6. Gen o Secuencia Endógena: Gen o secuencia nucleotídica contenida originalmente en todo o en parte en el genoma de una o más especies del Género *Solanum*

30 **7. Planta transformada genéticamente** se refiere a aquellas plantas de *Solanum lycopersicum*, del género *Solanum*, o cualquier planta de fruto que haya sido transformada con una construcción génica que comprenda el promotor de la invención fusionado al gen o secuencia de DNA de interés.

8. **Molecular pharming** (Plantas Biofactorías) se refiere a la modificación, mediante técnicas de ingeniería genética, del contenido substancial de las plantas con objeto de enriquecerlo en uno o más compuestos que les confieran valor añadido. Entre las secuencias de DNA cuya expresión puede estar dirigida por el promotor de la invención, para su posterior empleo en molecular pharming se incluyen subunidades vacunales de origen vírico o bacteriano, péptidos o proteínas con actividad tolerogénica, péptidos, proteínas con actividad adyuvante o inmunomoduladora, biocidas, inmunoglobulinas, enzimas o proteínas reguladoras que catalicen o potencien la producción de metabolitos con actividad biológica o terapéutica, etc.

El objeto de la presente invención se refiere al promotor del gen CNH1, que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 2 o al menos una secuencia que presenta el 70% de identidad con SEQ. ID. NO: 2, que dirige la expresión de secuencias o genes de interés en altos niveles en todos los tejidos de la planta, especialmente en el fruto, durante los distintos estadios de desarrollo. En una realización particular, la expresión dirigida por este promotor en el fruto es similar a la proporcionada por el promotor constitutivo CaMV35S, y al menos un orden de magnitud inferior, preferentemente de 3 a 6 veces menor, en el resto de la planta.

Otro objeto de invención se refiere a construcciones nucleotídicas que comprenden el promotor de la invención operativamente fusionado a un gen o secuencia de DNA que codifica para un péptido de interés.

En una realización particular dicho péptido de interés tiene aplicación en "molecular pharming". En otra realización particular el péptido de interés tiene aplicación en la producción de un medicamento. En otra realización particular, dicho gen o secuencia de DNA codifica proteínas o péptidos endógenos de la especie *Solanum*. En otra realización particular, dicho gen o secuencia de DNA codifica para proteínas o péptidos heterólogos a la especie *Solanum* (proteínas vegetales, animales o sintéticas). En otra realización particular, dicho gen o secuencia de DNA codifica para inmunoglobulinas, concretamente para la Inmunoglobulina A.

Otro objeto de invención se refiere a los vectores que contienen la secuencia nucleotídica de la invención.

Otro objeto de invención está dirigido a las células de plantas que contienen la construcción nucleotídica de la invención.

8

Otro objeto de invención se refiere a las plantas modificadas genéticamente que comprenden la construcción de la invención.

En una realización particular dichas plantas son plantas de *Solanum lycopersicum*, o plantas del género *Solanum*.

5 En otra realización particular, dichas plantas comprenden cualquier planta de fruto.

Otro objeto de invención se refiere a las semillas de las plantas modificadas genéticamente.

10 Otro objeto de invención se refiere al fruto de las plantas modificadas genéticamente.

Otro objeto de la invención se refiere al uso del promotor para dirigir la expresión de genes de interés en plantas caracterizado porque dicha expresión se produce en altos niveles en toda la planta, con niveles mayores en el fruto durante los distintos estadios de desarrollo.

15 Otro objeto de invención se refiere al uso del promotor para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés en plantas cuando más de un promotor constitutivo es necesario para expresar dos o más proteínas recombinantes de forma concertada y preferentemente en el fruto.

20 Otro objeto de invención se refiere al uso del promotor en estrategias de tipo "plantas biofactoría".

Otro objeto de invención se refiere a SEQ. ID. NO: 2.

La invención proporciona los métodos para obtener las plantas transgénicas y la progenie de las mismas que comprenden la construcción y partes de tales plantas,

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1.** Muestra los valores de expresión relativos del mRNA de CNH1 en diferentes tejidos de la planta de tomate, calculados mediante PCR cuantitativa. En esta representación, a los niveles de mRNA observados en ovarios en el estadio de antesis se les asignó arbitrariamente un valor igual a uno.

Figura 2. Representa el vector de expresión pCNH1::GFPGUS. El vector de expresión incluye el promotor CNH1 en sentido 5' de las secuencias fusionadas GFP-GUS y resistencia a kanamicina para selección de semilla entre los bordes derecho e izquierdo (RB y LB respectivamente). La resistencia a la espectinomicina es para la selección de cultivos.

Figura 3 Muestra los valores resultantes de la cuantificación de la actividad específica glucuronidasa (GUS) conferida por la construcción pCNH1: GFPGUS en diferentes órganos de la planta de tomate. Se comparan estos valores con la actividad específica conferida por la construcción 35S::GFPGUS en otra planta de la misma especie. La actividad específica de la glucuronidasa (GUS) presente en los extractos crudos de tejido vegetal se representa como nanomoles del producto metil-umbeliferona generadas por el enzima GUS por minuto y por miligramo de proteína total presente en el extracto.

Figura 4. Muestra una tinción histoquímica de actividad GUS en secciones de tomates en diferentes estadios de desarrollo. De izda a dcha se muestran frutos en expansión (15 días post- antesis), frutos en estadio verde-maduro (35 días post antesis), frutos en estadio pintón y frutos rojos respectivamente. En el apartado A se muestran frutos transformados con la construcción pCNH1::GFPGUS. En el apartado B se muestran frutos transformados con la construcción CaMV35S::GFPGUS.

Figura 5. Muestra en valores relativos y mediante experimentos de expresión transitoria en fruto, la potencia del promotor CNH1 para dirigir la acumulación de la proteína fluorescente verde (GFP) en fruto verde y maduro y la compara con la actividad del promotor 35S en los mismos órganos y estadios fisiológicos. Se agroinyectaron los frutos o bien con una mezcla (1:1) de las construcciones CaMV35S:GFP/GUS y CaMV35S:DsRed (muestras etiquetadas 35S) o bien con una mezcla (1:1) de las construcciones pCNH1:GFPGUS y CaMV35S:DsRed (muestras etiquetadas CNH1). (Figura 5A) Imagen de escaneo de muestras de frutos 35S y NH que presentan fluorescencia verde como resultado de una transformación transitoria. (Figura 5B) Ratio de fluorescencia verde/roja de muestras diferentes como medida de la fuerza relativa del promotor en cada estadio fisiológico. (MG) frutos recogidos en el estadio verde-maduro; (Br) frutos recogidos en el estadio pintón.

Figura 6. Representa una construcción nucleotídica en la que se emplea el promotor CNH1 para la producción recombinante en tomate, preferentemente en frutos y en estadios previos a la maduración, de una inmunoglobulina A con actividad de unión

frente al péptido VP8* de rotavirus. La inmunoglobulina A consta de dos cadenas polipeptídicas, ligera y pesada. La cadena pesada se sitúa bajo el control de un promotor constitutivo derivado de CaMV35S, mientras que el promotor CNH1 dirige la expresión de la cadena ligera. La construcción consta de un vector derivado de pK7GW con resistencia a Spectinomicina (Sm/SpR) y que incluye los siguientes elementos: RB: borde derecho; LB: borde izquierdo; KanR: gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en el proceso de transformación; attB1, attB4, attB3 y attB2: pequeñas secuencias de recombinación subproducto del mecanismo de clonación empleado en la construcción del fragmento (recombinación homóloga mediada por clonasa LR); 35S: doble promotor constitutivo derivado de CaMV35S; SP: péptido señal para dirigir la entrada de la proteína subsiguiente en el sistema de endomembrana celular, donde resultan más estables las inmunoglobulinas; IgH: secuencia nucleotídica de una cadena pesada de una inmunoglobulina humana con afinidad frente a VP8*, NosT: terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa; CNH1: el promotor de la presente invención; IgL: la secuencia nucleotídica de una cadena ligera de inmunoglobulina A humana. Las flechas indican marcos de lectura abiertos.

Figura 7. Western blot en condiciones desnaturalizantes, no reductoras de extractos crudos de frutos de tomate agroinfectados con el fragmento de T-DNA de la figura 6 (carril 1); frutos agroinfectados con una construcción no relacionada (carril 2); hojas agroinfectadas con el fragmento de T-DNA descrito (carril 3)

Figura 8. Actividad Anti-VP8* extractos crudos de tomates agroinyectados con el fragmento de T-DNA de la figura 6. Se incubaron placas de ELISA cubiertas con VP8 con diluciones de extractos crudos y se desarrollaron con anticuerpo anti-IgA-HRP humano. Barras blancas: CNH1 que contiene construcción de T-DNA. Barras negras: construcción de T-DNA no relacionada.

Figura 9. Secuencia del fragmento del promotor CNH1 empleado para la construcción de pCNH1-GUS/GFP (SEQ. ID. NO: 2). La figura muestra como la secuencia del cebador GSP3 usada para la amplificación sin el fragmento de recombinación está destacada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los avances en ingeniería genética han proporcionado las herramientas necesarias para transformar plantas que contengan genes extraños. Ahora es posible producir plantas que tienen características únicas de importancia en el procesamiento

agronómico y la cosecha. La capacidad de elegir los tejidos en los que se expresan tales genes extraños y el tiempo durante el crecimiento de la planta para obtener expresión resulta posible mediante la elección del promotor, la secuencia reguladora que activa el gen.

- 5 Para seleccionar el gen putativo a partir del cual obtener el promotor constitutivo de la invención, se construyó una biblioteca de cDNA de fruto de tomate usando el kit de construcción de biblioteca de cDNA lambda ZAPII (Stratagene, LaJolla, Calif.). Se convirtió la biblioteca de cDNA en una biblioteca de plásmido mediante escisión en masa, y se sembraron en placa clones bacterianos y réplicas de esta biblioteca
- 10 correspondientes a alrededor de 5.000 clones se obtuvieron sobre filtros (siguiendo Maniatis, Sambrook y Fritsch 1982).

- Cada filtro de réplica se hibridó entonces con sondas de cDNA preparadas a partir de dos muestras que representaban frutos reunidos en diferentes estadios de desarrollo y tejidos vegetativos reunidos de *Solanum lycopersicum*. Se usó la técnica de cebador de
- 15 secuencia aleatoria PCR (RP-PCR – *random primed PCR*) descrita por Li Z y Thomas TL. (*PEI1, an Embryo-Specific Zinc Finger Protein Gene Required for Heart-Stage Embryo Formation in Arabidopsis*, 1998, Plant Cell 10:383) para marcar las sondas de cDNA. Se usó la hibridación de cada colonia a cada sonda para determinar las colonias que representan genes constitutivos o específicos de tejido putativos. Se identificaron los
- 20 clones constitutivos putativos y se sometieron a caracterización adicional. Se determinó la identidad de cada clon mediante secuenciación de DNA y búsquedas en bases de datos.

- El clon denominado CNH1 fue seleccionado entre los clones constitutivos putativos elegidos para caracterización adicional basándose en sus altos niveles de expresión, revelados mediante el análisis RNA dot blot. El análisis Northern blot mostró
- 25 que CNH1 se expresa en altos niveles en el conjunto de muestras tanto vegetativas como de fruto. La RT-PCR cuantitativa confirmó que CNH1 se expresó en todos los tejidos analizados, pero especialmente en el fruto (figura 1). La figura 1 muestra los niveles de expresión relativos de CNH1 en distintos tejidos, tomando como referencia los niveles de expresión en ovarios en antesis. Se observan niveles de expresión similares en raíces,
- 30 hojas, plántulas, y "ovarios a 5 días post-antesis (5dpa), y fruto rojo, mientras que los niveles son especialmente altos en el fruto verde, similares a los que se obtienen con el promotor Ca35S (entre 3 y 6 veces más altos que en los tejidos vegetativos).

El análisis de secuencia indicó que CNH1 codificó para un gen de función desconocida, y que CNH1 corresponde a un gen identificado como no positivo en un proyecto de secuenciación de cDNA denominado SGN-U212704.

Con el fin de aislar el promotor CNH1, fue necesario emplear un método simple para clonar secuencias de DNA genómico desconocidas adyacentes a una secuencia conocida, y en este caso se llevó a cabo una aproximación de "paseo genómico", usando el kit universal GenomeWalker™ (Clontech). Usando los fragmentos de DNA genómico, la primera etapa fue construir conjuntos de fragmentos de DNA genómico ligado a adaptador, no clonado, denominadas "bibliotecas Genome Walker". Para ello, el DNA de partida debe estar bien limpio y presentar un peso molecular promedio alto, dado que se consideró como el método más adecuado para obtener este DNA a partir de tejidos jóvenes como los presentes en plántulas de tomate.

Alícuotas separadas de DNA fueron completamente digeridas con enzimas de restricción diferentes que dejaron extremos romos y posteriormente, cada lote de DNA genómico digerido se ligó por separado a un adaptador diseñado. En este caso, los adaptadores fueron proporcionados por el kit.

Después de que se construyeran las bibliotecas, se realizaron dos amplificaciones mediante PCR. La primera o PCR primaria requirió un cebador de adaptador externo (AP1, SEQ. ID. NO: 4) que se proporcionó en el kit, y un cebador específico de gen externo (GSP1, SEQ. ID. NO: 5) diseñado a partir de la secuencia de gen conocida 5'UTR. Entonces se diluyó la mezcla de PCR primaria y se usó como molde para una PCR secundaria o "anidada" con el cebador adaptador anidado (AP2, SEQ. ID. NO: 6) también proporcionado en el kit, y un cebador específico para gen "anidado" (GSP2, SEQ. ID. NO: 7), que se diseñó tomando una parte de secuencia GSP1 (SEQ. ID. NO.: 5) y yendo en el sentido 5' a través del gen 5'UTR. El producto más grande (en tamaño) de esta PCR secundaria, que comprende una secuencia conocida en el extremo 5' de GSP2 (SEQ. ID. NO: 7) y que se extiende en el DNA genómico desconocido adyacente, se clonó en el vector pCR 2.1 –TOPO. Como sistema de clonaje, se propuso el empleo de un sistema clásico usando enzimas de restricción para colocar el fragmento de promotor aislado en el sentido 5' de o bien el gen indicador GUS o bien GFP lo que hubiera permitido comprobar la actividad del promotor. En lugar de esto, se usó el sistema Gateway que permite transferir fácilmente el fragmento de promotor en una variedad de diferentes sistemas de análisis a través de reacciones de recombinación de alta eficiencia. Los sistemas de clonaje Gateway, basados en recombinación homóloga, se

han vuelto una alternativa popular a los métodos tradicionales de clonaje basados en ligasa T4 para la construcción de casetes de expresión de planta ("GATEWAY vectors for *Agrobacterium-mediated plant transformation*", Karimi M, Inzé D y Depicker A., Trends Plant Sci, 2002, 7: 192-195). En este caso, se realizó una reacción PCR usando dos
5 cebadores altamente purificados y largos (attB1-GSP3 (SEQ. ID. NO: 8, 10) y attB2-GSP2 (SEQ. ID. NO: 9, 7)) conteniendo cada uno de ellos una secuencia de recombinación específica. Tras una primera reacción de recombinación denominada "reacción BP" usando el vector pDONR221, se formó un vector que contiene la secuencia de promotor flanqueada por los sitios de recombinación attL1 y attL2, y denominado
10 "vector pEntry". En este momento una segunda reacción de recombinación denominada "reacción LR" se realizó entre el vector pEntry y el vector pKGWFS7,0 (Plant Systems Biology, Ghent University), dando lugar al vector que se denominó vector "pDestination" y que contiene los sitios de recombinación específicos attR1 y attR2.

Tras esta segunda reacción, se logró un vector denominado vector "pExpression"
15 que contiene el fragmento de promotor en el sentido 5' de una secuencia GFP-GUS. Usando como vector de destinación pKGWFS7,0 que contiene un fragmento fusionado de GFP-GUS SEQ. ID. NO: 11 pudo comprobarse la actividad tanto de GFP como de GUS usando el mismo vector pExpression, lo cual también permitió seleccionar plantas de tomate transformadas debido a su resistencia a kanamicina de la semilla. Finalmente,
20 se introdujo el vector pExpression (pCNH1::GFPGUS, SEQ. ID. NO: 12) en *A. tumefaciens* LBA4404 para la transformación estable de la planta de tomate (Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V. (2003), *The ploidy level of transgenics plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (Lycopersicon esculentum Mill.) is genotype and procedure dependent*, Theor Appl Genet.
25 2003 Jan;106(2):231-8.

El ensayo fluorométrico de GUS confirmó el patrón de expresión de este promotor, demostrando la expresión de GUS, en todos los tejidos de plantas, pero especialmente en tejidos de fruto.

En paralelo, para acortar el tiempo para el análisis de la actividad del promotor en
30 frutos, se eligió la expresión génica transitoria mediada por *Agrobacterium* mediante agroinyección en frutos de tomate (Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A. (2006), *Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit*, Plant Physiol. 2006 Jan;140(1):3-11.). Con este fin se introdujo pCNH1::GFPGUS en *A. tumefaciens* C58 para estos ensayos de expresión transitoria y se inyectó

conjuntamente con disolución de pBIN 35S: DsRed transformada por *Agrobacterium*. Se exploraron pedazos de diferentes frutos para obtener valores relativos de fluorescencia GFP/DsRed.

Este ensayo de agroinyección de pCNH1-GUS/GFP confirmó de nuevo el patrón de expresión mediado por el promotor CNH1, mediante la detección de fluorescencia de GFP, en todos los tejidos de plantas, pero especialmente en tejidos de fruto.

Estos ejemplos demuestran la capacidad del promotor CNH1 para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés en plantas.

Para la transformación de la planta, un DNA de doble cadena que contenga el promotor de la invención puede ser introducido en el genoma de la planta por cualquier metodología adecuada. Ello incluye la infección de tejido vegetal con cultivos de *Agrobacterium* transformados con plásmidos derivados de *Agrobacterium tumefaciens*. También incluye el uso de liposomas, electroporación, tratamientos químicos, bombardeo de partículas u otros métodos alternativos para introducir DNA en el interior de las células, o la transformación mediada por virus o polen.

Un vector especialmente útil es pKGW0 (Karamini *et al*, 2002), derivado de pPZP200 (Hajdukiewicz *et al*, 1994), que incluye un marcador de resistencia a Kanamicina (Hellens *et al*, 2000) y un cassette gateway (Invitrogen life technologies) para facilitar el clonaje por recombinación homóloga, todo ello comprendido entre las secuencias conocidas como right border y left border y que delimitan el fragmento de integración en el genoma de la planta. Otros vectores conocidos en el estado de la técnica podrían ser empleados.

Cuando se obtiene un número suficiente de células que han integrado un gen de interés dirigido por el promotor de la presente invención, las células son regeneradas en plantas enteras usando un protocolo de regeneración apropiado a la planta huésped.

El promotor de la invención es de utilidad en aplicaciones en las que la expresión constitutiva fuerte de un gen o una secuencia de DNA (endógenos o heterólogos) es deseada en todos los tejidos de la planta, especialmente en el fruto en diferentes estadios de desarrollo, cuando niveles de expresión similares a los obtenidos por el promotor 35 S son deseados en el fruto pero no de forma tan elevada en el resto de la planta.

En función del gen o secuencia de DNA de interés cuya expresión sea dirigida a través del promotor CNH1, dicho promotor puede ser útil en "molecular pharming

approaches" para inmunización oral, como factoría de proteínas que albergan por sí mismas actividad biológica o terapéutica por vía oral o que regulan o catalizan la producción de otros compuestos metabólicos con actividad biológica o terapéutica por vía oral (vacunas orales, tolerógenos, biocidas, anticuerpos neutralizantes, adyuvantes, compuestos antioxidantes, vitaminas, aromas, suplementos dietéticos); en la producción de complejos multiproteicos que requieran expresar de forma concertada dos o más genes con distintos promotores constitutivos para evitar reordenaciones génicas y/o procesos de silenciamiento génico; en la adquisición de fenotipos de resistencia a patógenos, para la modificación de la arquitectura del fruto otorgando a la planta y al fruto distintas propiedades en función del gen o secuencia nucleotídica que se exprese bajo su control.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACIÓN

EJEMPLO 1

Tal como se indicó, el procedimiento se inició aislando DNA genómico de plántulas de tomate crecidas en la oscuridad. Se llevó a cabo la extracción de DNA genómico usando el minikit Dneasy Plant (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante.

A partir de este DNA genómico, se hicieron varios grupos de DNA unidos a adaptadores y denominados "bibliotecas". Con este fin se realizaron cuatro digestiones de DNA separadas usando cuatro enzimas de restricción diferentes, EcoRV, DraI, PvuII y SspI. Se realizó la digestión de DNA a 37°C durante la noche usando 80 unidades de cada enzima de restricción, 2,5 µg de DNA genómico, 1x tampón de enzima de restricción en un volumen total de 100 µl. Se purificaron los fragmentos digeridos usando un volumen igual de fenol, transfiriendo la fase acuosa a un tubo nuevo y aplicando un volumen igual de cloroformo. Se aisló la fase acuosa resultante y dos volúmenes de etanol al 95% frío, 1/10 volumen de NaOAc 3 M (pH 4,5) y se añadieron 20 µg de glicógeno. Tras centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos, se lavó el sedimento obtenido usando etanol al 80% helado y tras el secado al aire, se disolvió el sedimento en 20 µl de TE (10/0,1, pH 7,5). Se ligaron los fragmentos de DNA de cada grupo de digestión a adaptadores de 48 pb (SEQ. ID. NO: 3) a ambos lados. Se llevaron a cabo las ligaciones de DNA usando una ligasa T4 en una reacción durante la noche a 16°C y se pararon las reacciones a 70°C durante 5 minutos.

Tras la construcción de las bibliotecas, se realizaron dos reacciones de PCR para cada biblioteca usando dos cebadores diseñados a partir del adaptador, un primer

cebador denominado AP1 (SEQ. ID. NO: 4) y un segundo cebador anidado denominado AP2 (SEQ.ID.NO: 6). La primera reacción de PCR requirió el cebador AP1 y un primer cebador específico de gen (GSP1) (SEQ. ID. NO: 5) que se diseñó de modo que su secuencia empezó en la posición -4 y contenía el codón ATG de CNH1.

- 5 Se diluyó el producto de PCR 1:50 y se usó para una segunda reacción de PCR usando el cebador adaptador anidado (AP2) (SEQ. ID. NO: 6) y un segundo cebador específico para gen (GSP2) diseñado a partir de la posición -37 (SEQ. ID. NO: 7).

Se usó la mezcla Advantage Genomic Polymerase (Clontech) para reacciones de PCR. Primera serie de reacciones de PCR: (94°C, 25 s/ 72°C, 3 min.) x 5 ciclos, (94°C,
10 25 s/ 67°C, 3 min.) x 32 ciclos, (67°C, 7 min.) x 1 ciclo. Tras esta serie, se usaron 5 µl para comprobar fragmentos haciendo pasar un gel de agarosa al 1,5% TAE1x, y sólo en aquellos casos sin producto de PCR se realizaron 5 ciclos adicionales (94°C, 25 s/ 67°C, 3 min.). Se diluyó este primer producto de PCR 1:50 y una segunda serie de reacciones de PCR siguieron: (94°C, 25 s/ 72°C, 3 min.) x 5 ciclos, (94°C, 25 s/ 67°C, 3 min.) x 20
15 ciclos, (67°C, 7 min.) x 1 ciclo.

Como resultado de esta reacción de PCR secundaria usando el cebador AP2 (SEQ. ID. NO: 6) y el cebador GSP2 (SEQ. ID. NO: 7), se observó el mayor producto de PCR (3,7 kb) en la biblioteca EcoRV, que se comprobó haciendo pasar en un gel de agarosa al 1,2 % TAE1x y se extrajo. Se llevó a cabo la purificación de la banda
20 resultante usando el kit de extracción en gel MinElute (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante, así se obtuvo un volumen final eluido de 10 µl. Se clonó el fragmento en un TOPO TA vector de clonaje pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y se usó el cebador AP2 (SEQ. ID. NO: 6) para la secuenciación de la región 5' del fragmento clonado. Se obtuvo un fragmento genómico de 3,7 kb y tras la secuenciación se encontró que presenta 97 pares
25 de bases de la región transcrita en sentido 5' SGN-U212704 así como sus secuencias promotoras novedosas. Esto confirmó que de hecho, se ha aislado una secuencia de DNA en sentido 5' del gen CHN1. SEQ. ID. NO: 1 muestra un fragmento de 3711 pb que oscila desde la posición -7 (esto es, a 7 pares de bases en sentido 5') del sitio de inicio de traducción putativo de CNH1. La secuencia que corresponde al adaptador Genome
30 Walker también se ha destacado en la secuencia.

Para facilitar el clonaje de un fragmento de promotor necesario para ser usado posteriormente para dirigir la expresión de genes endógenos o heterólogos o secuencias de DNA se siguió una estrategia de clonaje Gateway. Para esto se diseñó un oligocebador GSP3 adicional en el sentido de 3' de la secuencia de adaptador para

añadir la secuencia de recombinación attB1 (SEQ. ID. NO: 8) a la secuencia autentica en el sentido 5'. SEQ. ID. NO: 2 muestra la secuencia resultante de 3657 pb del fragmento de promotor usado en la construcción de pCNH1-GUS/GFP para dirigir la expresión de genes endógenos o heterólogos o secuencias de DNA en plantas tal como sigue.

- 5 Se amplificó el fragmento de promotor de 3657 pb mediante PCR usando una parte del cebador GSP2 unido a una secuencia de recombinación attB2 (SEQ. ID. NO: 9) y GSP3 (SEQ. ID. NO: 10). La secuencia de cebador GSP3 usada para amplificación sin el fragmento de recombinación está destacada en la Figura 9. Se recombinó el fragmento así obtenido en una reacción BP con el vector pDONR221 para proporcionar un vector
- 10 pEntry. Para hacer esto, se realizó una reacción a 25°C según las instrucciones del fabricante (Invitrogen), usando entre 15 y 150 ng del producto de PCR, 1 µl de pDONR221, tampón TE y 1X mezcla de reacción BP ClonaseII. Tras una hora, se añadió 1 µl de proteinasa K y se incubó la reacción a 37°C durante 10 minutos. Se transformaron células competentes de *E. coli* TOP 10 y se sembraron en placa en un medio de agar
- 15 más Kanamicina LB y tras una incubación durante la noche a 37°C se observaron colonias. Tras controlar varias minipreparaciones de las colonias candidatas obtenidas, se obtuvo el vector pEntry y las positivas se comprobaron posteriormente mediante análisis de restricción de endonucleasa, y secuenciación.

- Se realizó la reacción LR según el fabricante a 25°C, usando 200 ng del vector
- 20 pEntry y 300 ng del vector pDestination, tampón TE y 1X mezcla de reacción LR ClonaseII. Se usó el vector binario pKGWFS7,0 (Karimi *et al.*, 2002) como vector pDestination, que se consideró más adecuado para un ensayo de actividad de promotor debido al GFP-GUS dual (SEQ. ID. NO:11) que se fusionó en el sentido de 3' del sitio de recombinación attR2. Se realizó la selección de los clones transformados en un medio de
- 25 agar más espesfomicina LB selectivo. La construcción de expresión resultante pCNH1::GFP-GUS se muestra en la figura 2.

EJEMPLO 2

- El plásmido pCNH1::GUS/GFP tal como se describió en el ejemplo 1, se usó para transferir el casete CNH1::GUS/GFP (SEQ. ID. NO: 13) en un genoma de tomate de tipo
- 30 natural *Solanum lycopersicum* mediante el método de transformación de disco de hoja (Horsch, y modificado tal como en Ellul *et al.* 1993.). Se recogieron las plantas transgénicas y se sometieron a ensayo para expresión GUS según Jefferson *et al.* (1987) EMBO J. 6:390. La figura 3 muestra los niveles de actividad enzimática GUS obtenidos en diferentes órganos de una planta transformada con el T-DNA CNH1::GUS/GFP y

donde por tanto el gen GUS se encuentra regulado por el promotor de la invención (barras blancas). Estos niveles se comparan con los conferidos por un promotor constitutivo de referencia CaMV35S, fusionado de forma similar frente al gen GUS e introducido en la planta como casete de expresión 35S::GUS/GFP (SEQ. ID. NO: 14) (barras negras). Como se puede observar en la figura 3, CNH1 confiere expresión a GUS en todos los órganos de la planta, sin embargo esta expresión es mucho más fuerte en el fruto a lo largo de su desarrollo, siendo en este órgano sus niveles de expresión muy similares a los que confiere el promotor de referencia CaMV 35S. Los niveles máximos de actividad GUS conferidos por CNH1 son de 24 nanomoles de metilumbeliferona producida por minuto y miligramo de proteína total en los extractos crudos de fruto de tomate en estadio verde-maduro. Se puede concluir que los promotores CaMV 35S y CNH1 difieren en su capacidad de discriminación entre el fruto y el resto de tejidos de la planta. Por tanto se concluye que el promotor CNH1 es útil para conseguir la expresión de genes de forma ubicua en toda la planta pero especialmente alta (similar a CaMV35S) en el fruto.

EJEMPLO 3

En este ejemplo, el casete CNH1::GUS/GFP (SEQ. ID. NO: 13) introducido en plantas de tomate tal y como se describe en el ejemplo 1, es detectado mediante tinción histoquímica en el fruto siguiendo el protocolo descrito por Jefferson *et al.*, id., con el objetivo de determinar la distribución de la actividad GUS conferida por CNH1 en los distintos tejidos del fruto. De izda a dcha, la figura muestra un fruto en expansión (15 días post- antesis), un fruto en estadio verde-maduro (35 días post antesis), un fruto en estadio pintón y un fruto rojo respectivamente. En la figura 4a se aprecia que la distribución de la tinción GUS dirigida por CNH1 se extiende a todos los tejidos y todos los estadios de desarrollo estudiados. En la figura 4b se muestra, en una imagen similar, la actividad GUS conferida por el promotor constitutivo CaMV35S en el fruto incluido en la construcción 35S::GUS/GFP (SEQ. ID. NO: 14). La comparación de ambas imágenes prueba que CNH1 puede ser utilizado de forma análoga a CaMV35S como promotor constitutivo en el fruto de tomate. De lo expuesto en la figura 4 se concluye que el promotor CNH1 resulta ideal como promotor endógeno para la expresión de proteínas recombinantes en el fruto cuando se pretende una expresión ubicua y constitutiva en este órgano, ya que su expresión incluye a todos los tejidos y a los diferentes estadios de desarrollo, de forma análoga a lo que se observa con el uso de un promotor constitutivo de referencia como CaMV35S. El uso del promotor CNH1 resulta por tanto muy conveniente cuando se requiere un promotor que facilite una acumulación continuada y a

altos niveles de un producto génico en el fruto, especialmente si este promotor ha de ser un promotor endógeno.

EJEMPLO 4

El promotor CNH1 es útil para dirigir la expresión de proteínas recombinantes, y en particular de la proteína fluorescente verde (GFP), en ensayos de expresión transitoria en fruto. Los ensayos de expresión transitoria, descritos por Orzáez *et al* (2006), son útiles para determinar la viabilidad de una determinada construcción génica para su expresión en fruto. Los ensayos de expresión transitoria tienen una eficiencia de transformación limitada y por tanto requieren construcciones con promotores que confieran fuerte expresión en los distintos tejidos del fruto, dado que de otra forma no se podrá detectar el producto del gen recombinante. Una prueba de la idoneidad de un promotor para su uso en ensayos de expresión transitoria en fruto consiste en determinar su capacidad para dirigir niveles de expresión detectables y cuantificables de la proteína fluorescente verde. La capacidad para dirigir la expresión de otra proteína indicadora, la proteína fluorescente verde (GFP), de la nueva secuencia de promotor, se demostró en tejidos de fruto usando el ensayo de agroinyección transitoria en el modo que se describe en Orzaez *et al.* (2006). Se cultivó una suspensión de agrobacterias que llevaba la construcción CNH1-GUS/GFP en LB hasta DO 0,5 y luego se diluyó en MS hasta DO 0,05. Se inyectaron doscientos microlitros de la suspensión de bacterias en frutos de tomate en desarrollo a través del pedúnculo del fruto. Se cosecharon los frutos cuatro días tras la agroinyección y se siguió la expresión de la GFP indicadora dirigida por el CNH1 detectando la fluorescencia de pedazos de frutos usando un escáner Typhon (figura 5a). La expresión transitoria de GFP conferida por CNH1 fue detectada en un escáner de fluorescencia (figura 5a izda), y comparada con la conferida por CaMV35 en la construcción CaMV35-GUS/GFP (figura 5a dcha). Para corregir las variaciones debidas a la eficiencia de cada transformación, se utilizó como estándar interno la construcción CaMV35:DsRed, que dirige la expresión constitutiva de una proteína fluorescente roja. Esta construcción se usó como estandar interno para normalizar las variaciones en fluorescencia verde debidas a la eficiencia de la transformación transitoria. La fluorescencia emitida por los frutos agroinyectados se midió a los cuatro días post inyección (verde-maduro) u ocho días post inyección (representando estadios de pintón). Para ello, secciones ecuatoriales de frutos se escanearon en un escáner de fluorescencia usando dos canales de excitación diferentes de 488 nm (para detección de GFP) y de 532 nm (para detector DsRed), calculándose los ratios verde/rojo de intensidad entre ambos canales medidos en 4 posiciones diferentes de cada fruto. Para cada promotor

ensayado, los valores absolutos detectados en el canal de fluorescencia verde se dividieron frente a los valores absolutos detectados en el canal rojo, obteniéndose así una estimación de la actividad relativa de cada promotor. En la figura 5b se muestran los resultados de dicha comparación: el promotor CNH1 rindió niveles cuantificables de GFP, el rango de los obtenidos con CaMV35S en estadio verde (etiqueta MG), aunque inferiores en estadio pintón (etiqueta Br). Este ejemplo permite concluir que el promotor endógeno CNH1 confiere niveles de expresión de GFP detectables en fruto y que dichos niveles son suficientes para realizar en ensayos de expresión transitoria en fruto.

EJEMPLO 5

Este ejemplo muestra el uso conjunto de los promotores 35S y el promotor de la invención CNH1 para la expresión conjunta en el mismo T-DNA de una inmunoglobulina A (IgA) humana frente a rotavirus. La IgA realiza una función de inmunoprotección pasiva en las mucosas. Los frutos comestibles pueden ser una excelente plataforma para la producción de IgAs recombinantes frente a virus enteropatógenicos, reduciendo los costes tanto de producción como de purificación. Las IgAs están formadas por dos cadenas polipeptídicas, ligera y pesada, y por tanto su producción en fruto requiere la expresión concertada de ambos genes en el fruto a altos niveles. La inclusión de secuencias repetitivas en las construcciones génicas destinadas a la producción recombinante de proteínas en plantas da lugar a pérdidas de eficiencia debido a procesos de recombinación, delección y silenciamiento génico. Por tanto, para producir complejos multiproteicos como IgA en fruto, resulta importante disponer de más de un promotor constitutivo con actividad en el fruto. En este ejemplo se describe la construcción y expresión transitoria en fruto de un T-DNA para la expresión de IgA humana frente a rotavirus en fruto de tomate. En esta construcción se utiliza promotor de la invención CNH1 para dirigir la expresión de la cadena ligera, mientras que la expresión de la cadena pesada es dirigida por el promotor CamV35S.

El T-DNA del presente ejemplo se construye incorporando secuencialmente las construcciones de la cadena pesada y ligera al vector de expresión pK7GW (Karimi *et al* 2002). En primer lugar las secuencias nucleotídicas de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina A humana isotipo alpha 1 (SEQ. ID. NO: 15) (IgHalpha1) y de la región constante de la cadena ligera humana isotipo lambda (Iglambda1) (SEQ. ID. NO: 16) se introducen por recombinación homóloga en el vector pDNOR221 (Invitrogen), generando los vectores pENTRIgHalpha y pENTRIgLambda respectivamente. Sobre este vector se injertan por digestión con enzimas de restricción y posterior ligación las

secuencias variables pesada (SEQ. ID. NO: 17) y ligera (SEQ. ID. NO: 18) del anticuerpo de cadena sencilla 2A1 frente a rotavirus descrito por Monedero *et al* (2004), generando los vectores pENTRIgAlpha2A1 y pENTRIgLambda2A1 respectivamente. Por recombinación homóloga entre pENTRIgAlpha2A1 y el vector de destino pK2GW7,0 (Karimi *et al* 2002) se generó en vector de expresión pK235S_ IgAlpha2A1_NosT. En paralelo, y mediante triple recombinación homóloga entre un vector de entrada conteniendo al promotor CNH1, el vector pENTRIgLambda2A1 y un tercer vector de entrada conteniendo el terminador T-Nos y el vector de destino pKGW,0 (Karimi *et al* 2002) se generó el vector de expresión pKNH_ IgLlambda2A1_NosT que contiene un cassette de expresión con el promotor CNH1, la cadena ligera Llambda2A1 y el terminador T-Nos. Finalmente, dicho cassette de expresión se incorporó en el vector pK235S_ IgAlpha2A1_NosT por digestión con enzimas de restricción y posterior ligación. El vector resultante contiene un T-DNA que se muestra en la Figura 6 (SEQ. ID. NO: 19) y que incorpora los elementos necesarios para la expresión en fruto de una IgA humana frente a rotavirus: Se construyó un fragmento de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía los siguientes elementos desde 5' hasta 3': (1) el left border integrativo (SEQ. ID. NO: 20); (2) un casete completo para resistencia a kanamicina en plantas (SEQ.ID.NO: 21); (3) un sitio de recombinación attB1 como subproducto de recombinación LR (SEQ. ID. NO: 22); (4) un promotor 35S doble (SEQ. ID. NO: 23); (5) un sitio de recombinación attB4 como subproducto de recombinación LR (SEQ. ID. NO: 24); (6) el péptido señal pectato liasa de tomate para dirigir la expresión de inmunoglobulina para el sistema de endomembrana de estabilización (SEQ. ID. NO: 25); (7) una región variable de inmunoglobulina humana de cadena pesada con afinidad frente al péptido VP8* de la cepa de rotavirus SA11 (SEQ. ID. NO: 17); (8) el dominio constante de inmunoglobulina alfa humana de cadena pesada; (SEQ. ID. NO: 15); (9) un sitio de recombinación attB3; (SEQ. ID. NO: 26); (10) el terminador nopalina sintasa para terminación de trascripción eficiente; (SEQ. ID. NO: 27) (11) y un sitio de recombinación attB1 (SEQ. ID. NO: 22); (12) el promotor CNH1 (SEQ. ID. NO: 2); (13) un sitio de recombinación attB4 (SEQ. ID. NO: 24); (14) el péptido señal pectato liasa de tomate (SEQ. ID. NO: 25); (15) una región variable de inmunoglobulina humana de cadena ligera con afinidad frente al péptido VP8* de la cepa de rotavirus SA11 (SEQ. ID. NO: 18); (16) la región constante de inmunoglobulina lambda humana de cadena ligera (SEQ. ID. NO: 10); (17) un sitio de recombinación attB3 (SEQ. ID. NO: 26) (18) el terminador nopalina sintasa (SEQ. ID. NO: 27); (19) y un sitio de recombinación attB2 (SEQ.ID.NO: 28). (20) el right border de T-DNA (SEQ. ID. NO: 29) (figura 7).

La presencia de promotor CNH1 dirigiendo la expresión de inmunoglobulina humana de cadena ligera actúa como factor limitante, garantizando que se produzcan niveles altos de IgA humana recombinante funcional anti rotavirus sólo en tejidos en el que CNH1 es activo (es decir principalmente en el fruto).

- 5 Se transfirió de manera transitoria el T-DNA descrito anteriormente a células de fruto de tomate usando el procedimiento de agroinyección (Orzaéz *et al* 2006). Se detectó la presencia de IgA humana recombinante frente a rotavirus en extractos brutos de frutos de tomate en Western blot y ELISA. La figura 8a muestra la detección en fruto (línea 1) mediante Western blot de las cadenas pesada y ligera de IgA. No se detectó IgA en frutos control agroinfiltrados sólo con CamV35S:GFP/GUS, mientras que la expresión de ambas cadenas fue indetectable en hoja de tomate agroinfiltrada con el mismo T-DNA. Se demuestra de esta forma que ambas cadenas de IgA se expresan en el fruto y que el promotor CNH1 es eficiente para la producción de complejos IgA en el fruto cuando se necesita el concurso de más de un promotor constitutivo en el fruto. La ausencia de IgA detectable en hoja se interpreta como resultado de los niveles bajos de expresión de IgL conferidos por CNH1 en hoja y la inestabilidad de IgH en ausencia de IgL.
- 10
- 15

- La figura 8b muestra cómo los extractos crudos de tomates agroinfiltrados con el T-DNA de la figura 7 son capaces de unir específicamente el antígeno de rotavirus contra el que fueron inicialmente seleccionados (VP8*). Extractos sin diluir y diluciones 1:10 de los extractos reaccionaron fuertemente frente al antígeno en ensayos ELISA (barras blancas), mientras que extractos de frutos control agroinyectados con la construcción 35S:GFP/GUS muestran sólo una señal basal en placas tapizadas con el antígeno. Se demuestra por tanto que el concurso de CNH1 permite la expresión de complejos proteicos funcionales en el fruto.
- 20

REINVINDICACIONES

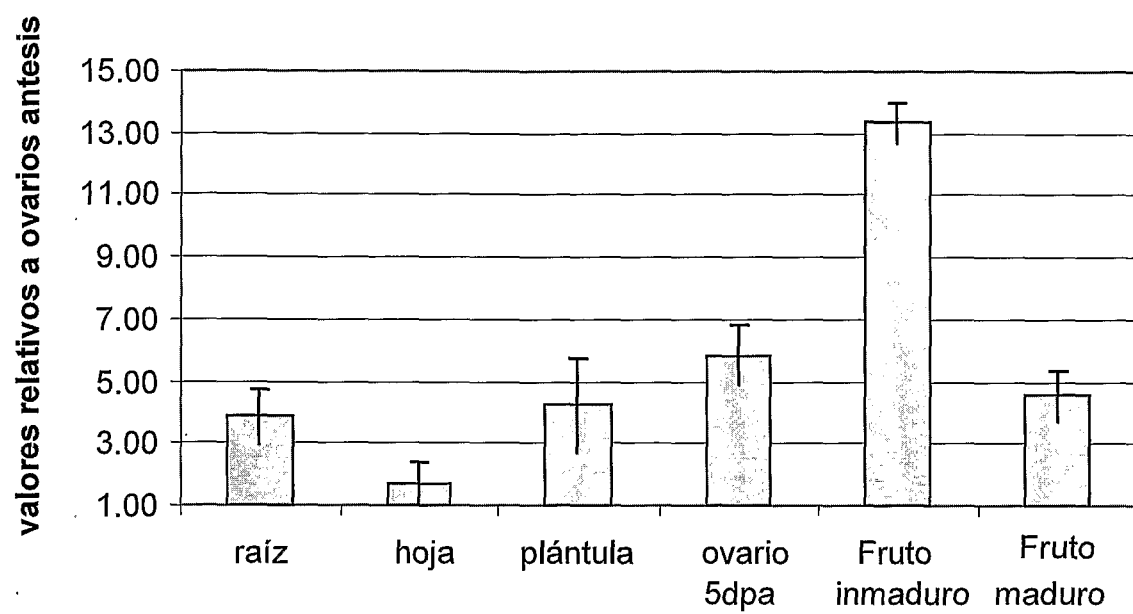
1. Promotor constitutivo CNH1 que comprende la secuencia SEQ. ID. NO: 2 o al menos una secuencia que presenta el 70% de homología con SEQ. ID. NO: 2.
- 5 2. Promotor constitutivo según reivindicación 1 caracterizado por dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés en altos niveles en toda la planta, con niveles más altos en el fruto.
3. Promotor constitutivo según reivindicación 2 caracterizado porque dicha expresión en el fruto, es similar a la proporcionada por el promotor constitutivo CaMV35S.
- 10 4. Promotor constitutivo según reivindicaciones anteriores caracterizado porque dicha expresión en el resto de la planta es al menos un orden de magnitud inferior que la expresión en el fruto.
5. Promotor constitutivo según reivindicación 4 caracterizado porque dicha expresión en el resto de la planta es de 3 a 6 veces menor que en el fruto.
- 15 6. Promotor constitutivo según reivindicaciones 1-5 caracterizado porque la expresión de los genes de interés que dirige, se produce durante todos los diferentes estadios de desarrollo de la planta y del fruto.
7. Construcción nucleotídica caracterizada por comprender el promotor según reivindicaciones 1-6 operativamente unido a un gen o secuencia de DNA de interés que da lugar a la producción de una secuencia de RNA que codifica para una proteína o péptido de interés.
- 20 8. Construcción nucleotídica según reivindicación 7 caracterizada porque dicha secuencia de DNA o gen de interés es homólogo o heterólogo al promotor según reivindicación 1-6.
9. Construcción nucleotídica según reivindicaciones 7-8 caracterizada porque dicha proteína o péptido de interés presenta utilidad en molecular pharming.
- 25 10. Construcción nucleotídica según reivindicaciones 7-9 caracterizada porque dicha proteína o péptido de interés es de utilidad en la producción de medicamentos.
11. Construcción nucleotídica según reivindicaciones 7-10 caracterizada porque dicha proteína o péptido de interés es una inmunoglobulina.

12. Construcción nucleotídica según reivindicación 11 caracterizada porque dicha inmunoglobulina es IgGA.
13. Vector que comprende la construcción nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.
- 5 14. Célula de planta que comprende la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.
15. Célula de planta según la reivindicación 14 donde dicha planta pertenece al género *Solanum*.
- 10 16. Célula de planta según reivindicación 15 donde dicha planta es *Solanum lycopersicum*.
17. Célula de planta según reivindicación 14 donde dicha planta pertenece a cualquier especie de plantas que presenten fruto.
18. Célula de planta según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde la proteína o péptido de interés es heterólogo a dicha planta.
- 15 19. Célula de planta según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18 donde dicha proteína o péptido pertenece a la especie *Solanum*.
- 20 20. Célula de planta según reivindicación 19 donde dicha proteína o péptido de interés pertenece a *Solanum lycopersicum*.
21. Planta transgénica que comprende la construcción nucleotídica según reivindicaciones 7-12.
22. Planta transgénica según reivindicación 21 caracterizada por pertenecer al género *Solanum*.
23. Planta transgénica según reivindicación 22 caracterizada por ser *Solanum lycopersicum*.
- 25 24. Planta transgénica según reivindicación 21 caracterizada por pertenecer a cualquier especie de plantas que den fruto.
25. Semilla de planta según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24.

26. Fruto de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24.
27. SEQ. ID. NO: 2.
28. Uso del promotor según reivindicaciones 1 a 6 para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés en plantas caracterizado porque dicha expresión se produce en altos niveles en toda la planta, con niveles mayores en el fruto.
29. Uso del promotor según reivindicación 28 caracterizado porque dicha expresión en el fruto es similar a la obtenida en toda la planta al emplear promotor 35S.
30. Uso del promotor según reivindicaciones 28-29 caracterizado porque los niveles de expresión en el resto de la planta son aproximadamente un orden de magnitud inferior que en el fruto.
31. Uso del promotor según reivindicación 30 caracterizado porque dicha expresión en el resto de la planta es de 3 a 6 veces inferior que en el fruto.
32. Uso del promotor según reivindicaciones 28 a 31 para dirigir la expresión de genes o secuencias de DNA de interés en plantas cuando más de un promotor constitutivo es necesario para expresar dos o más proteínas recombinantes de forma concertada y preferentemente en el fruto.
33. Uso del promotor según reivindicaciones 28 a 32 en estrategias de tipo "plantas biofactoría".

1/6

FIG 1



2/6

FIGURA 2

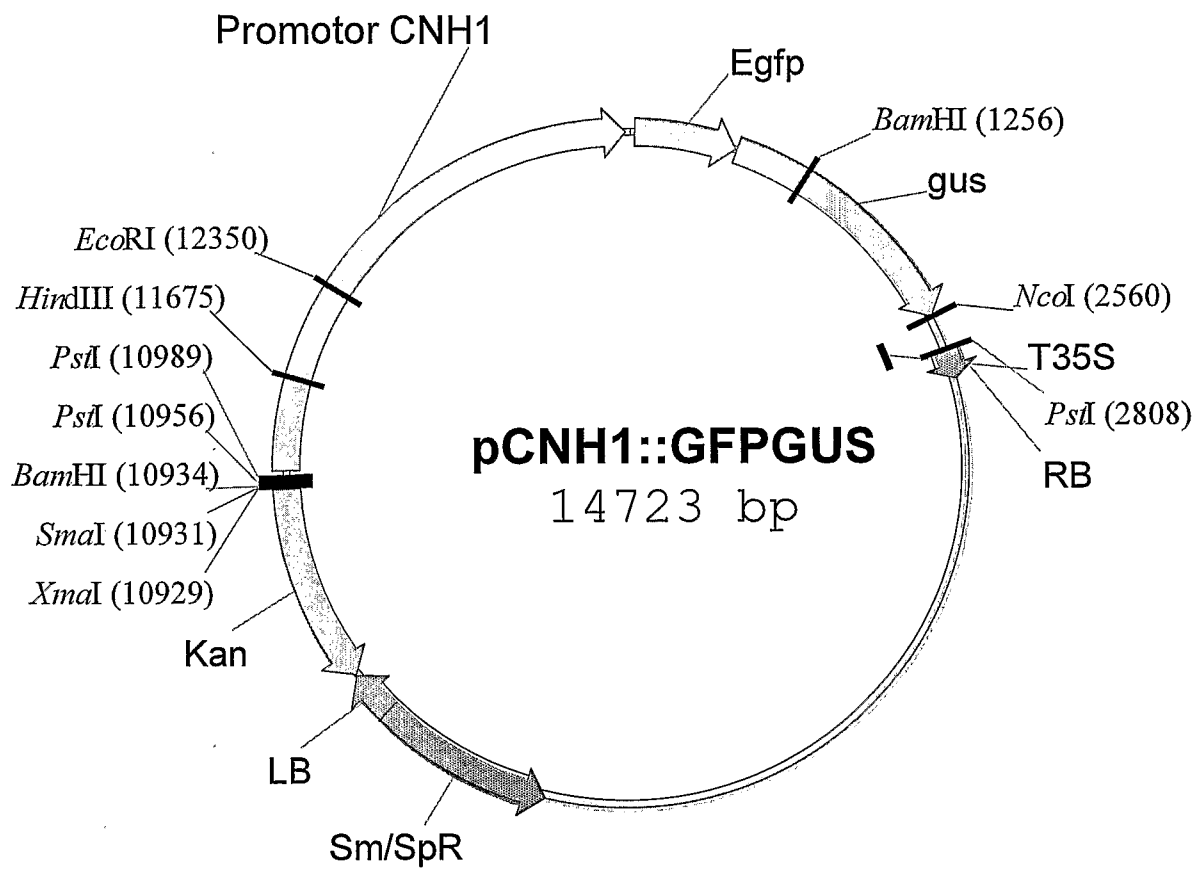


FIGURA 3

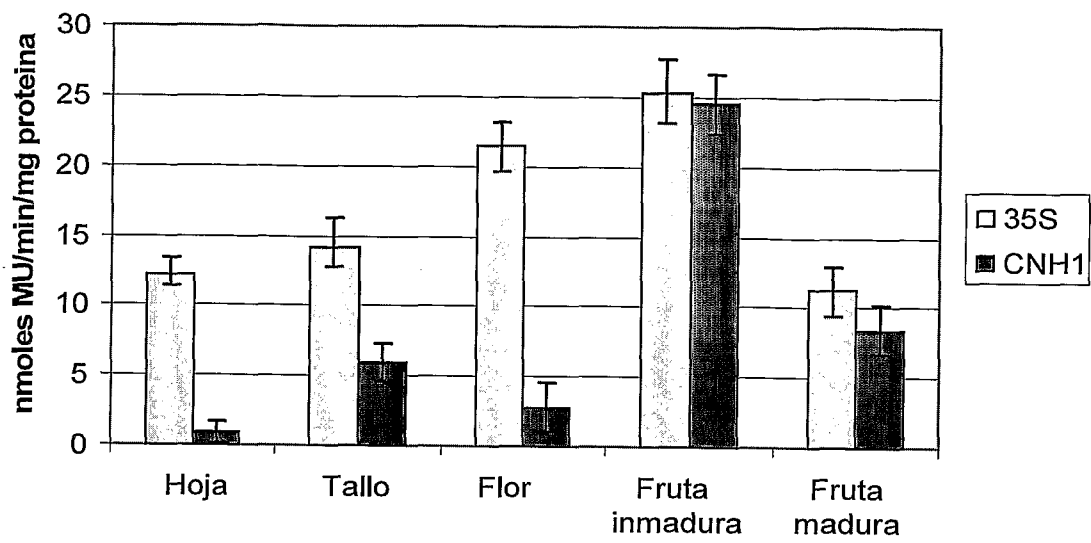
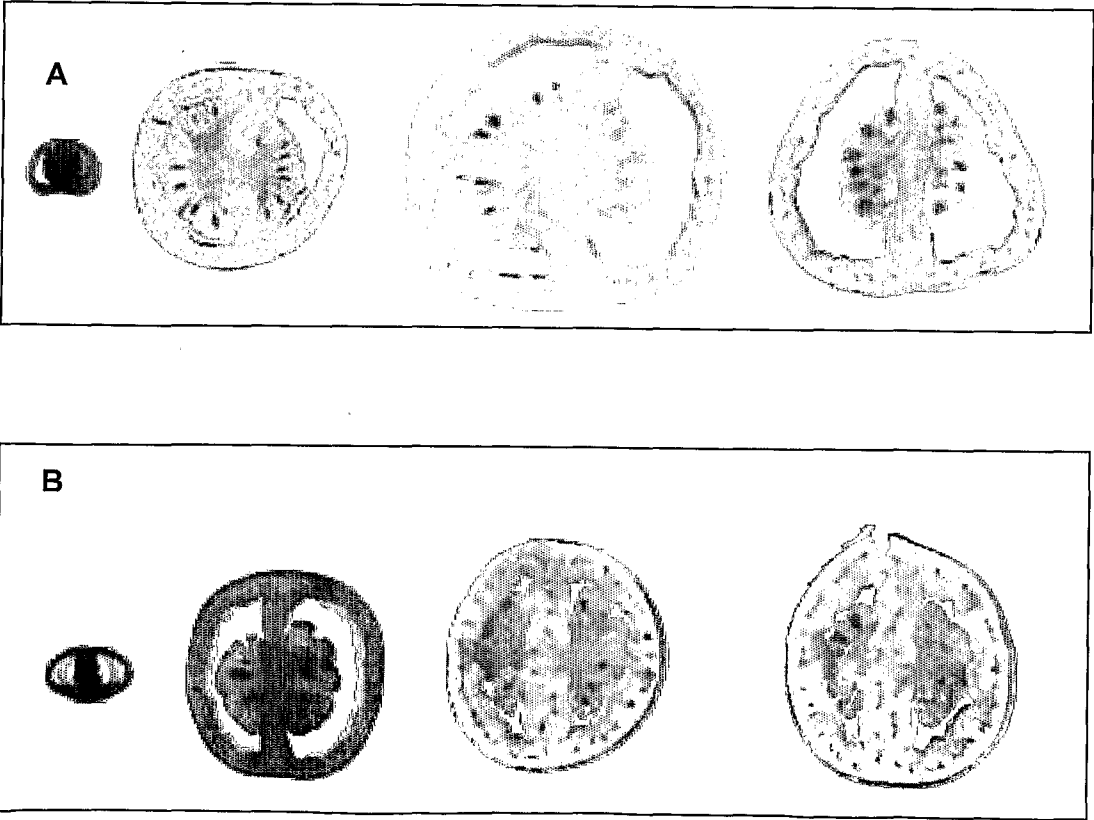


FIG 4



4/6

FIG 5

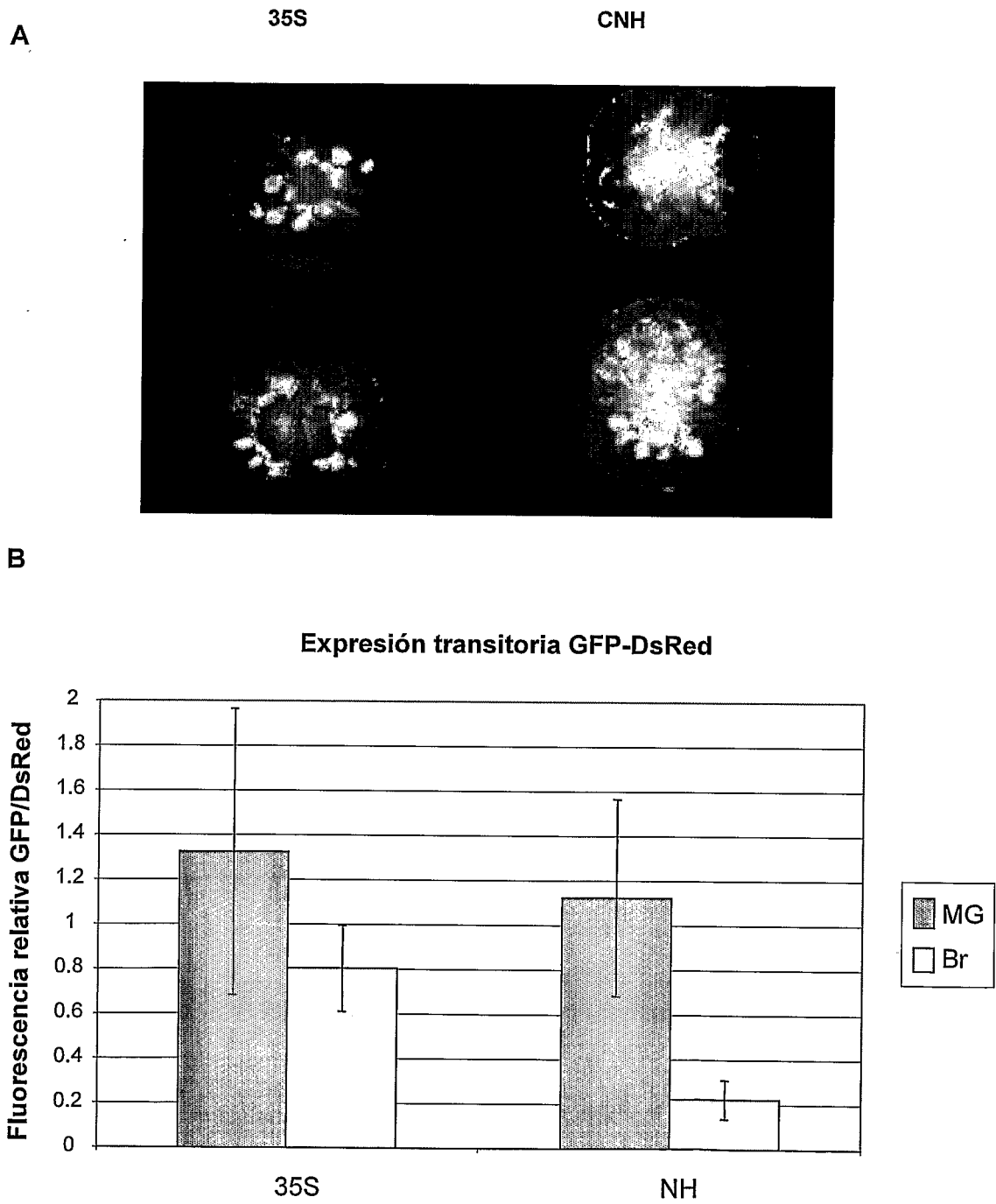


FIG 6

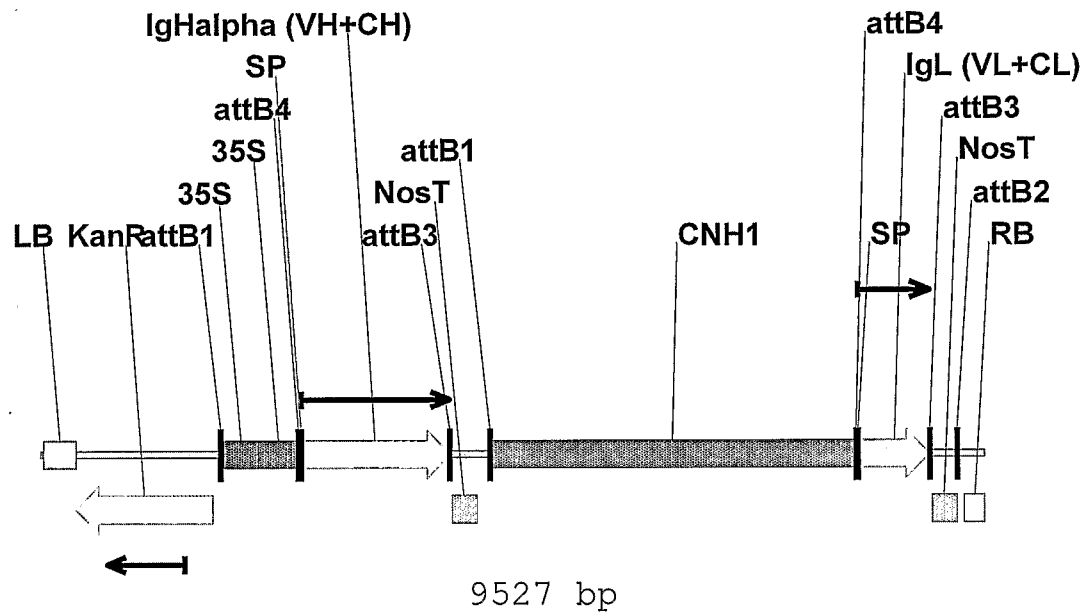
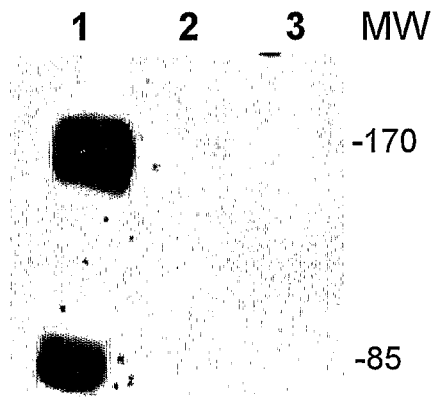


FIG 7



6/6

FIG 8

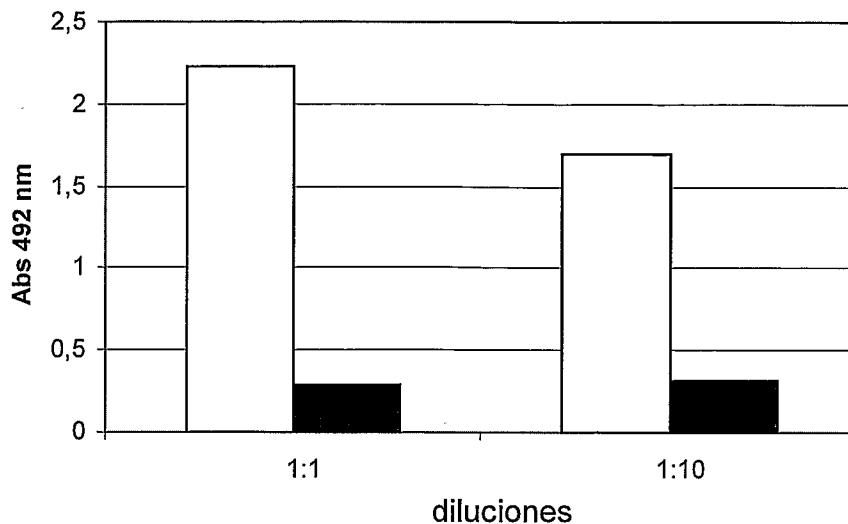


FIG 9

ATCATTTCACGAAAAAGGTTAATTAGAATCCCTTAACCTCTGCTTGACTTCGCTATCGCTCGTTCATTTGTAAGAATATCGTCAAA
CATCATTCGTCTCTACGGGAATTATTTATTTCTTAAAAAGAAAAATCTATAACATTATATATATAATTTTAGGATAGCCTAAC
GTTACATGTAAAGTTATAGTCACGTGATCAAAAAGTCATCATAAAGGATAAATATATTTCCGAGTTATCTTAAATGGTATGAAGATAC
TCTCCGTCATACTTTTGAGACATTGGAGCCCTGTCTGTTCAAAAACCTAGAGCAAAATATGTCTTCATTTCTAAAAGAAGACTAAATAGG
AAAACGTGACATAATCTTATCCGTTGATCCGATATTTAATAACGGTCATATCGGTGGATAAAAATTGCGACACGTGTATGTCCATTAGT
ATAAAAGGTATATATGCTCTAATTTTAAACGACAGGGACAACAATATCTCAAAAGTATGACGAAGGATGTATCTACATACCATTTCT
TATAATTCGGAGTATATTTGCTTGTCTCTTTAACTATAAAGAACAACCTCGTACAAAAATATAAGCGCTATTGACTTAATTTTCC
TCCAAACATGGCGTATAACTAAAGCTTAGTACATCCGACTGTCTTCGGTCAAACTACATACATATAAGATAAAGAGCNTGGGCNAAT
GACACAAATCCAGCGTGGCAAAATCAGAGAAAGTAAATGAAAATGGGGCCCAATAGCACGAGTAGTACTACCTGGANAAGCATCCAA
AGGGTCTTAATANGGGCCCACTAGGCCCAATNAAGTAGGGCCCATTTAGAGAAAGCCCAAGGATTTAGATCTAAAAAGGAAGTGC
CACGTCAGAAATATGGGGCCCATTTAGACGTNAATGGTCTGTAATTTGNGATAGTGGGGGCCCATTTAGCACCGGCCCTTCACTATTAAAT
TTGGACTTTACGTTTCAACCAANTTGTCCACAATCNAAAATANTAATAAATAATCAACTTGCCCTTTTATTTTCTTCAAAATTCCT
AAACATTCCTCATCTTGACTAGTATTGTAGAAAAAAACATTTTACTATTTTGGTGAAATTTTGATGTGATTTTACTCTAATGTAATTT
TACTGTTGTTAATGAAAGGTGTGTCATGCCGACAATAAATAAATAAAGATAATTCATGTAAAAATTTATTTTCAATTTAACGAGA
TCTGAAAGGATCGTCATATTTCAAAAAGAGTAATGTAGGTAGTTTATCTTCAGCATGTATTAATGTCTGATCATGACCCGAATTCGT
GATTTAATAGATCGATCCAAATCCAAAGCGGCAACAGAAAATGTATAATCAAAAATAGTAATATCACAGGTTAAGTTGTTTAAATATTTT
TTTTATTTAATTTATACGATGCGAAGAGGTATGGAGCTTTTGATTTAACTATAATATAATATTGGTTTGGTTATAAAACTTTTGAAAT
ACACGACTTAAACCTATGAAATATTTAATAAGTTAAATATTTTATAGATTGTAACATATTTTATAATTTTGCAAATAAAACACCTA
TTAAATGAATTTAACTAAAAATATATATCATACCACATTTGATAAATGCACACATAGTTAAAAGAAAATATGTTTCACTAATTTAA
CATTTTATACAATAAATTTGCGAGATCCAAATACATAACATTAACCAATTAAGATAAGATAAAGGTTAGAGTCATTATTTACATGGATTAGCAA
CTTAATTCATTCGAGCGATAAAAGTTGTGATAGAATGATAAATATTTTGTGATTTTAAATTTAAATAGAAATTTCAAAATTCAAA
CGTTAGTTACGAAAGCATGATTTGTACAGAATATATATTAAGTATAACTTTTCGATATGAATCAAAATTCATTCGAACCCCTACTGA
ACGTTGGATGGGAAATTTTAAAAAATTAATTAATTTCTTAAACCAAGGAGATTTTGTGTAAGGAACATAAATTAAGAAAAAGAT
TAATTTTAAAAAATTAGAAGAACATGAAGCATGATGGTCTTAGTCACCTACATGCCCTACTGCACAAAACAGAAAAGAAAAAGAT
ATAATAGCTGTATAGTAAATGGTCTCCACCACCATGTGGCATTGCTATTTCCCAATCAAAACAAGTGCTTTTAGACAACCTAATAA
ATGAATTTATTAATTAATTTTAAAAAATAATTTGTGTTGAGTCGAAGATCTATCGAATCACATATGTTTAGTTATCCTTTAA
GGTAAAAATGAGATTTTCATGTACACACTATTTCTTCTGCGGCATGAGACTAATCTATGTTATGTTTACTGTATTATTAAGTAGAA
AATGCCAATTTTGAATAAATAAGGAAAAAATAAATAATGTGTTGAATATTTTCTTAGAAAAATATTCGATGTGAATTTA
TTCATATTTGGTGGTCTTAAATTTGAATGAAAAGATTAATAAGTAATTAATGAATATGTAATGTACCAACCGGAAAGGTTTTATTT
TCAAAATAAATAAGGAAGCAAAAGGAAAAAGATGTGTTAAGAGTGTCTTCTATAAGAGATTGTTAATGTGAACCTATTATATTG
TCGATTTAATGTTTGAATAAATAAATTTATAATCTTGTCAAAAGAAAAAATCTTCTCATATTGAAAATCAAAAAGGAAAAAATGTGTA
AGAATATTTATTTTCTTAAATTTATTCATATTATCAATCTCAAGTTCAAATTAATAAATAAATTAATTTATAATGCCATGAAGAAAA
AAATTCGCCCGCTTGAAGAACATAAAGAGAGAGGGGAAAGAGGATACAAATTTGTTTATTTAATTAAGATTTTCGTTTTGTGATT
GTTGAAATTTTAACTGTTTTATTCATAAGTCTTAAATTCGAACATATGAATTTTAAAAAATCCTCAATAAAGGTTGTTTTAC
TTATAAATACCATCTAATGTTTAAAGCATATATTTAGAAAAAGAGTTTCAAAATTTCAAAATTTTAAATTTTAAATTTCTAT
AATAATAGCTAAAAAATGGATATTTGTGAATTTTACTATGTGTTTACTTGATGGACTTACCCATTAGAATCTAGACTAATCGAATGT
GTAAATTTAAATATCCGATAATTATAACAATAACAACAGACTGAATATTTCCATATATATATATAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAAATCTTAATTTCTATCTAAAGGTAATTTTAAATAGATCTCAACTCGCGTATGAATGGATTAACTTATATTTATATAAGGTAAG
GAAAAAAGGAATATTTGTATGATTACTATTTTCTTATTTATATAAACATAAAGTAAAGTAAAGTAAATACATTTACAACCTAG
ACATCCAAATCTTTGTACACCCTTAATTTGTCACTGATATGAGGTGTCAATATGTATATACTTGAAGATTTCTTTTTCTTCCATTAA
TTAATTTTATATTAATACACTCCATTTTACTTTCTCTATATAAGCTCTCTCATTGTATCATTTCATCACAAAATTACAATTAC
AAATATTTTGGCCCTTCCATTTCTTAATTTATTTTCTCTTCCATCTTCTTATTTTCCAACTT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9746690 A1 (ZENECA LIMITED). 11.12.1997, page 1, line 1 - page 3, line 8; page 8, lines 10 -28; claims 1-5.	1, 7-33
A	US 6340748 B1 (Ro et al.). 22.01.2002, column 1, line 31 - column 2, line 15; claim 1.	1, 7-33
A	US 6127179 (DellaPenna et al.). 03.10.2000, column 3, lines 26 - 56; claims 1-6.	1, 7-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26.November.2009 (26.11.2009)

Date of mailing of the international search report

(02/12/2009)

Name and mailing address of the ISA/

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 91 349 34 04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Box II.2

Claims 2-6 define the invention in terms of the result sought and lack technical features. A promoter is defined by the sequence thereof, and what increases or reduces the expression thereof, any specific tissue, etc. is the result of the sequence. The subject matter of claims 28-33 can be claimed in the form of a "use of the promoter for..." .

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000375

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746690 A	11.12.1997	CA 2252366 A AU 2967497 A EP 0906435 AB AU 726697 B JP 2001501810 T US 6239331 B AT 308619 T ES 2247629 T DE 69734512 T	11.12.1997 05.01.1998 07.04.1999 16.11.2000 13.02.2001 29.05.2001 15.11.2005 01.03.2006 01.06.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000375

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 15/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000375

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	WO 9746690 A1 (ZENECA LIMITED). 11.12.1997, página 1, línea 1 - página 3, línea 8; página 8, líneas 10 -28; reivindicaciones 1-5.	1, 7-33
A	US 6340748 B1 (Ro et al.). 22.01.2002, columna 1, línea 31 - columna 2, línea 15; reivindicación 1.	1, 7-33
A	US 6127179 (DellaPenna et al.). 03.10.2000, columna 3, líneas 26 - 56; reivindicaciones 1-6.	1, 7-33

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

26.Noviembre.2009 (26.11.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02-DICIEMBRE-2009 (02/12/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

Mª D. García Grávalos

N° de teléfono +34 91 349 34 04

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000375

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a. Tipo de material
 - ☒ una lista de secuencias
 - ☐ tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b. Formato del material
 - ☒ en papel
 - ☒ en formato electrónico
 - c. Fecha de presentación/entrega
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
 - ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000375

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 2-6
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Estas reivindicaciones son de resultado y carecen de características técnicas. El promotor se define por su secuencia y el que aumente o disminuya la expresión de la misma, o que sea tejido específica, etc., es el resultado de su secuencia. Se pueden reivindicar como "uso del promotor para..." lo que ya esta recogido en las reivindicaciones 28-33.
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000375

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 9746690 A	11.12.1997	CA 2252366 A AU 2967497 A EP 0906435 AB AU 726697 B JP 2001501810 T US 6239331 B AT 308619 T ES 2247629 T DE 69734512 T	11.12.1997 05.01.1998 07.04.1999 16.11.2000 13.02.2001 29.05.2001 15.11.2005 01.03.2006 01.06.2006

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 15/00 (2006.01)