



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 529**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04740603 .8**

86 Fecha de presentación : **03.07.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1711612**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Casetes de expresión para la expresión transgénica bi-direccional de los ácidos nucleicos en vegetales.**

30 Prioridad: **22.07.2003 DE 103 33 479**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **SunGene GmbH**
Corrensstrasse 3
06466 Gatersleben, DE

72 Inventor/es: **Heim, Ute;**
Herbers, Karin y
Kunze, Irene

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 289 529 T3

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

DESCRIPCIÓN

Casetes de expresión para la expresión transgénica bi-direccional de los ácidos nucleicos en vegetales.

5 La invención se relaciona con casetes y vectores de expresión que comprenden promotores bidireccionales de vegetales, y con el uso de estos casetes o vectores de expresión para la expresión transgénica de las secuencias de ácidos nucleicos en organismos vegetales. La invención además se relaciona con organismos de vegetales transgénicos transformados con estos casetes o vectores de expresión, con los cultivos, partes o material de propagación derivados de estos, y con el uso de los mismos para producir alimentos humanos y animales, semillas, productos farmacéuticos o químicos finos.

10 La producción de plantas transgénicas es una técnica fundamental de biotecnología vegetal y de esta manera prerrequisito indispensable para la investigación fundamental en los vegetales, y para producir plantas que han mejorado, las propiedades novedosas para la agricultura, para incrementar la calidad de los alimentos humanos o para producir productos químicos o farmacéuticos particulares. Un prerrequisito básico para la expresión transgénica de genes particulares en plantas es la condición de los promotores específicos de la planta. Varios promotores de plantas son conocidos. Los promotores constitutivos que se utilizan en la actualidad predominantemente en plantas son casi exclusivamente promotores virales o promotores aislados del *Agrobacterium* tal como, por ejemplo, el promotor del virus mosaico del coliflor CaMV355 (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-812). El aumento de la complejidad del trabajo en biotecnología vegetal con frecuencia requiere la transformación con una pluralidad de construcciones de expresión. El uso múltiple de uno y el mismo promotor es especialmente problemático en plantas, porque la presencia múltiple de secuencias reguladoras idénticas puede dar lugar a que la actividad del gen se intercambie completamente (silenciador) (Kumpatla *et al.* (1998) TIBS 3:97-104; Selker (1999) Cell 97:157-160). De esta manera existe un incremento de la necesidad de promotores novedosos. Una manera alternativa de ocuparse de este problema es el uso de los promotores así llamados "bidireccional", i.e. secuencias reguladoras que resultan en la transcripción de las secuencias de ADN en dirección 3' en ambas direcciones. Es posible en este caso por ejemplo que se introduzca un gen diana y un gen marcador en una célula bajo el control de una secuencia de ADN.

30 A la fecha, la expresión transgénica bajo el control de promotores bidireccionales ha sido descrita escasamente. La producción de promotores bidireccionales a partir de promotores polares para la expresión de ácidos nucleicos en plantas por medio de fusión con otros elementos transcripcionales se ha descrito (Xie M (2001) Nature Biotech 19: 677-679). El promotor 35S así mismo se ha convertido en un promotor bidireccional (Dong J Z *et al.* (1991) BIO/TECHNOLOGY 9: 858-863). WO 02/64804 describe la construcción de un promotor bidireccional complejo basado en la fusión de los elementos promotores potenciadores y nucleares de varias secuencias virales (CaMV 35S, CsVVMV) y de plantas (Act2, PRb1b). US20020108142 describe una secuencia reguladora a partir de un intrón de la proteína IV como la transferencia del fosfatidilinositol a partir del *Lotus japonicus* (PLP-IV; GenBank Acc. No.: AF367434) y el uso de esta como promotor bidireccional. Este fragmento intrón tiene una actividad transcripcional solamente en la zona de infección de los nódulos. Otros tejidos, raíces, hojas o flores no muestran ninguna mancha.

40 Los promotores de plantas que permiten expresión bidireccional, ubicua (i.e. sustancialmente tejido-no específico) y constitutiva en plantas no han sido revelados a la fecha.

45 WO 03/006660 describe un promotor de un gen ferredoxina putativo, y las construcciones de expresión, vectores y plantas transgénicas que comprenden este promotor. La secuencia flanqueante-5' aislada de 836 bp combinada al gen de glucuronidasa sorprendentemente muestra un patrón de expresión constitutiva en tabaco transgénico. La secuencia corresponde a un segmento de secuencia en el cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana* según lo depositado en GenBank bajo elthe Acc. No. Z97337 (versión Z97337.2; par de bases 85117 a 85952; el gen inicial a bp 85953 se anota con fuerte similaridad a la ferredoxina [2Fe-2S] I, "Nostoc muscorum"). La actividad detectable en las anteras del polen del brote de la flor cerrada fue solamente débil, y en las flores maduras fue cero. Contrario al prejuicio derivado de los descubrimientos de literatura contra la conveniencia del promotor para la expresión eficiente de marcadores de selección (por ejemplo basado en la especificidad presumida de la hoja o la función en transporte de electrón fotosintético), fue posible demostrar la selección altamente eficiente por combinación con, por ejemplo, el gen resistente de la kanamicina (nptII). WO 03/006660 describe simplemente el uso como promotor constitutivo "normal". No se revela, el uso como promotor bidireccional.

60 Con el fin de integrar un número máximo de genes en un genoma vegetal vía un complejo de transferencia, es necesario limitar el número y tamaño de secuencias reguladoras para expresar los ácidos nucleicos transgénicos. Los promotores que actúan bidireccionalmente contribuyen a lograr este objeto. Es particularmente ventajoso utilizar un promotor bidireccional cuando sus actividades se presentan coordinadas en la misma fuerza y se localizan en un fragmento de ADN corto. Dado que hay poca aceptación para el uso de secuencias virales para la expresión en plantas transgénicas, es ventajoso utilizar secuencias reguladoras que son igualmente de plantas.

65 El objeto en el cual la presente invención se basó fue proporcionar los casetes de expresión transgénica que comprenden secuencias reguladoras de plantas que median la expresión bidireccional, ubicua y desarrollo-independiente (constitutivo) de dos secuencias de ácidos nucleicos que se deben expresar transgénicamente.

ES 2 289 529 T3

Este objeto se logra por la presente invención. El primer aspecto de la invención por consecuencia se relaciona con casetes de expresión para la expresión transgénica de dos secuencias de ácidos nucleicos en una célula vegetal que comprende al menos una secuencia reguladora seleccionada del grupo que consiste de

- 5 a) el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
- b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
- 10 b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, y
- 15 c) fragmentos equivalentes funcionalmente de las secuencias a) o b) o c), que tienen al menos 25 nucleótidos consecutivos de dichas secuencias a) o b) o c) y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, donde dicho elemento regulador se sitúa entre dos secuencias de ácidos nucleicos y es heterogéneo en relación con dicha secuencia de ácidos nucleicos y se une funcionalmente a dichas secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que la expresión de dos diferentes secuencias de ácido ribonucleico se producen en al menos una célula vegetal, donde dichas secuencias de ácido ribonucleico se seleccionan de las secuencias de ácido ribonucleico codificadas por
- 20 i) secuencias de aminoácidos o
- 25 ii) secuencias de ácido ribonucleico que producen una reducción en la expresión de al menos un gen endógeno de dicha célula vegetal.

La invención adicionalmente se relaciona con un proceso para la expresión transgénica de dos secuencias de ácido ribonucleico en células vegetales, donde un casete de expresión que comprende al menos una secuencia reguladora seleccionada del grupo que consiste de

- 30 a) el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
- b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
- 35 b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, y
- 40 c) fragmentos equivalentes funcionalmente de las secuencias a) o b) o c), que tienen al menos 25 nucleótidos consecutivos de dichas secuencias a) o b) o c) y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, se introducen en al menos una célula vegetal, donde dicho elemento regulador se sitúa entre dos secuencias de ácidos nucleicos y es heterogéneo en relación con dicha secuencia de ácidos nucleicos y se une funcionalmente a dichas secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que la expresión de dichas dos diferentes secuencias de ácido ribonucleico se produce en al menos la citada célula vegetal, donde dichas secuencias de ácido ribonucleico se seleccionan de las secuencias de ácido ribonucleico codificadas por
- 45 i) secuencias de aminoácidos o
- 50 ii) secuencias de ácido ribonucleico que producen una reducción en la expresión de al menos un gen endógeno de dicha célula vegetal.

55 La secuencia de ADN empleada en la presente invención como promotor bidireccional corresponde a la región intergen entre un gen de ferredoxina (FD) putativo y un gen de O-acetilserina liasa (OASTL) putativo en *Arabidopsis thaliana*.

60 Ha sido posible lograr particularmente buenos resultados en plantas de la familia Brassicaceae tal como, por ejemplo, arabidopsis o semilla oleaginosa de colza. Sin embargo, también fue posible lograr muy buenos resultados (especialmente sobre la expresión de marcadores de selección) en otras especies de plantas (tal como, por ejemplo, tabaco). La expresión "actividad" es sustancialmente independiente de la naturaleza del ácido nucleico en dirección 3'. El uso del promotor bidireccional es apropiado tanto para la expresión de marcadores de selección como para cualquier otro ácido nucleico.

65 En una modalidad preferida, por consecuencia, las dos secuencias de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente y se incluyen en los casetes de expresión de la invención, o las secuencias de ácido ribonucleico expresadas en el proceso de la invención, son diferentes. "Diferente" significa a este respecto que las secuencias de ácido ribo-

ES 2 289 529 T3

nucléico que se expresan transgénicamente iniciando de ambos lados del promotor bidireccional difieren una de la otra en al menos una base. Las dos secuencias de ácidos nucleicos preferiblemente codifican para proteínas diferentes, preferiblemente para proteínas que difieren en función y/o actividad.

La invención hace posible incrementar el número de unidades de transcripción con un número reducido de secuencias promotor. En el caso de fusiones de traducción también es posible regular más de dos proteínas. Una ventaja particular de esta invención es que la expresión de estos transgenes múltiples tiene lugar simultánea y sincronizadamente bajo el control del promotor bidireccional. El promotor es particularmente apropiado para coordinar la expresión de los ácidos nucleicos. Así, es posible expresar simultáneamente

- i) proteína diana y marcador de selección o proteína indicadora
 - ii) marcador de selección y proteína indicadora
 - ii) dos proteínas diana, por ejemplo a partir de la misma ruta metabólica
 - iii) ARN sentido y antisentido
 - iv) varias proteínas de defensa contra patógenos
- y muchas más, y producen efectos mejorados en las plantas.

“Expresión” comprende la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente, pero también puede - en el caso de un marco de lectura abierto en la orientación sentido - incluir la traducción del ARN transcrito de la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente en un polipéptido correspondiente.

“Casete de expresión para la expresión transgénica de ácidos nucleicos o proceso para la expresión transgénica de ácidos nucleicos” comprende todas aquellas construcciones o procesos producidos por métodos de ingeniería genética, en las cuales cualquiera

- a) uno de los promotores de la invención (por ejemplo el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 o un equivalente funcional de estos), o
- b) la secuencia de ácidos nucleicos que se expresan bajo el control de dicho promotor, o
- c) (a) y (b)

no están en su ambiente genético natural (i.e. en su locus del cromosoma natural) o han sido modificados por métodos de ingeniería genética, esto es posible para que la modificación sea por ejemplo una sustitución, adición, delección, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótido. En una modalidad preferida, la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa bajo el control de uno de los promotores de la invención es heteróloga en relación con dicho promotor, i.e. no está naturalmente bajo el control de estos, pero dicho control se ha producido de una manera no-natural (por ejemplo mediante procesos de ingeniería genética).

Los casetes de expresión de la invención, vectores derivados de estos o los procesos de la invención pueden comprender equivalentes funcionales para las secuencias promotor descritas en la SEQ ID NO: 1 o 2. Las secuencias equivalentes funcionalmente también comprenden todas las secuencias derivadas de la cadena equivalente complementaria de las secuencias definidas por la SEQ ID NO: 1 o 2, y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor. Equivalentes funcionales en relación con los promotores de la invención significa en particular mutaciones naturales o artificiales de las secuencias promotor descritas en la SEQ ID NO: 1 o 2, y sus homólogos a partir de otros géneros y especies de plantas que tendrán sustancialmente la misma actividad del promotor.

Una actividad del promotor se refiere como la misma sustancialmente si la transcripción de un gen particular que se expresa bajo el control de un promotor particular derivado de la SEQ ID NO: 1 o 2 bajo condiciones que son por otra parte iguales, muestra una localización dentro de la planta que es al menos 50%, preferiblemente al menos 70%, se prefiere particularmente al menos 90%, se prefiere muy particularmente al menos 95% coincidente con una expresión comparativa obtenida utilizando un promotor descrito por la SEQ ID NO: 1 o 2. Es posible en este caso que el nivel de expresión difiera hacia abajo y hacia arriba de un valor de comparación. Las secuencias preferidas a este respecto son aquellas cuyo nivel de expresión, medido por medio del mRNA transcrito o la proteína traducida posteriormente, bajo condiciones que son por otra parte iguales, difiere cuantitativamente por no más del 50%, preferiblemente 25%, se prefiere particularmente 10% a partir de un valor de comparación obtenido con un promotor descrito por la SEQ ID NO: 1 o 2. Las secuencias preferidas particularmente son aquellas cuyo nivel de expresión, medido por medio del mRNA transcrito o la proteína traducida posteriormente, bajo condiciones que son por otra parte iguales, excede cuantitativamente por más del 50%, preferiblemente 100%, se prefiere particularmente 500%, se prefiere muy particularmente 1000% de un valor de comparación obtenido con el promotor descrito por la SEQ ID NO: 1. El valor de comparación preferido es el nivel de expresión del mRNA natural del gen particular o del producto del gen natural. Otro valor de comparación preferido es el nivel de expresión obtenido con cualquier secuencia de ácidos nucleicos definida, preferiblemente aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican para las

ES 2 289 529 T3

proteínas fácilmente cuantificables. Se da preferencia muy particularmente a este respecto a las proteínas indicadoras (Schenborn E & Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44) tal como la "proteína fluorescente verde" (GFP) (Chui W L *et al.*, Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel S M *et al.*, Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), cloramfenicol transferasa, luciferasa (Millar *et al.*, Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414) o β -galactosidasa, con preferencia muy particular para la β -glucuronidasa (Jefferson *et al.* (1987) EMBO J. 6:3901-3907).

Las condiciones que son por otra parte iguales significa que la expresión iniciada por uno de los casetes de expresión para ser comparada no se modifica por combinación con secuencias control genéticas adicionales, por ejemplo secuencias control. Las condiciones iguales significan que todas las condiciones generales tal como, por ejemplo, especies de plantas, etapa de desarrollo de la planta, condiciones de cultivo, condiciones de ensayo (tal como solución reguladora, temperatura, sustratos etc.) se mantienen idénticas entre las expresiones que se comparan.

Las mutaciones comprenden sustituciones, adiciones, deleciones, inversiones o inserciones de uno o más residuos de nucleótidos. Así, la presente invención también comprende por ejemplo las secuencias de ácidos nucleicos que son obtenidas por modificación de un promotor según se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2. El propósito de una modificación de este tipo puede ser la delimitación adicional de la secuencia contenida en esta o, por ejemplo, de otra manera la inserción de otros sitios de división de enzima de restricción, deleción de ADN redundante o la adición de otras secuencias, por ejemplo otras secuencias reguladoras.

Donde las inserciones, deleciones de sustituciones tales como, por ejemplo, son apropiadas las transiciones y transversiones, es posible utilizar técnicas conocidas *per se*, tal como mutagénesis *in vitro*, reparación del cebador, restricción o ligadura. Los extremos complementarios de los fragmentos se pueden hacer disponibles ligando mediante manipulaciones tales como, por ejemplo, restricción de, retro-consumo o rellenando las protrusiones para los extremos romos. También se pueden obtener resultados análogos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de oligonucleótidos específicos.

La identidad entre dos ácidos nucleicos significa la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos sobre la longitud de la secuencia total en cada caso, que se calcula por comparación con la ayuda del algoritmo del programa GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA), fijando los siguientes parámetros:

Peso Hueco: 12

Peso Longitud: 14

Promedio Apareamiento: 2,912

Promedio Desapareamiento: -2,003

Por ejemplo, una secuencia que tiene una identidad de al menos 50% basado en los ácidos nucleicos con la secuencia de SEQ ID NO: 1 significa una secuencia que tiene una identidad de al menos 50% en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 1 por el anterior programa de algoritmo con el conjunto de parámetros de arriba.

Los equivalentes funcionales con el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 preferiblemente comprenden aquellas secuencias que tienen una identidad de al menos 80%, preferiblemente 90%, se prefiere particularmente al menos 95%, se prefiere muy particularmente al menos 98%, más preferiblemente 99%, con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y adicionalmente exhiben sustancialmente la misma actividad del promotor como la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Los equivalentes funcionales para el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 2 preferiblemente comprenden aquellas secuencias que tienen una identidad de al menos 80%, preferiblemente 90%, se prefiere particularmente al menos 95%, se prefiere muy particularmente al menos 98%, más preferiblemente 99%, a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 y adicionalmente exhiben sustancialmente la misma actividad del promotor que la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplos adicionales de las secuencias promotor empleadas en los casetes o vectores de expresión de la invención se pueden encontrar fácilmente por ejemplo en varios organismos cuya secuencia genómica se conoce, tal como, por ejemplo, a partir de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthium annuus*, *Linum sativum* por comparaciones de identidad en bases de datos.

El proceso para producir equivalentes funcionales de la invención preferiblemente comprende la introducción de mutaciones en un promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1. Una mutagénesis puede tomar lugar aleatoriamente, en el caso que las secuencias sometidas a mutagénesis posteriormente se protegen por sus propiedades por un procedimiento de prueba por error. Un criterio de selección particularmente ventajoso comprende por ejemplo una resistencia aumentada para un marcador de selección, el nivel de la expresión resultante de la secuencia de ácidos nucleicos introducida.

En otra modalidad de la invención es posible que los elementos reguladores esenciales de los promotores de la invención para ser aislados de una manera dirigida y empleada como tal o en combinación con otros elementos reguladores. Por consiguiente, un aspecto de la invención comprende los equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que comprenden al menos 25, preferiblemente al menos 50, se prefiere particularmente al menos 100, se prefiere muy particularmente al menos 200, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos consecutivos de

ES 2 289 529 T3

las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 o 2 y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2.

Alternativamente, las secuencias no esenciales de uno de los promotores de la invención pueden ser suprimidas sin deteriorar significativamente las propiedades mencionadas. Otro aspecto de la invención por consecuencia comprende los fragmentos equivalentes funcionalmente de una de las secuencias promotor de la invención que tienen al menos 25, preferiblemente al menos 50, se prefiere particularmente al menos 100, se prefiere muy particularmente al menos 200, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos consecutivos de una de las secuencias promotor de la invención y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2.

La delimitación de la secuencia promotor para las particulares regiones reguladoras esenciales también se puede abordar con la ayuda de una rutina de investigación para investigar a los elementos promotores. Con frecuencia, los elementos promotores particulares se presentan en grandes números en las regiones relevantes para la actividad del promotor. Este análisis se puede abordar por ejemplo usando programas de ordenador tal como el programa PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory ADN Elements") (Higo K *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res* 27:1, 297-300) o la base de datos BIOBASE "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig).

Los procesos para la mutagénesis de las secuencias de ácidos nucleicos son conocidos por trabajadores expertos e incluyen a modo de ejemplo el uso de oligonucleótidos que tienen una o más mutaciones comparadas con la región que se va a mutar (por ejemplo dentro del esqueleto de una mutagénesis de sitio específico). Los cebadores que tienen aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nucleótidos o más, se emplean típicamente, con preferiblemente cerca de 10 a aproximadamente 25 o más residuos de nucleótido que se localizan en ambos lados de la secuencia que será modificada. Los detalles y el procedimiento para dichos procesos de mutagénesis son familiares para los trabajadores expertos (Kunkel *et al.* (1987) *Methods Enzymol* 154:367-382; Tomic *et al.* (1990) *Nucl Acids Res* 12:1656; Upender *et al.* (1995) *Biotechniques* 18(1):29-30; U.S. Pat. No. 4,237,224). Una mutagénesis también se puede lograr por el tratamiento de, por ejemplo, vectores que comprenden una de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención con agentes de mutagénesis tal como hidroxilamina.

Las secuencias de ácidos nucleicos que se presentan en los casetes de expresión de la invención y que se expresan transgénicamente, se pueden unir funcionalmente a otras secuencias control genéticas además de uno de los promotores de la invención.

Un enlace funcional significa por ejemplo configuración secuencial de un promotor, de la secuencia de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente y, si es apropiado, otros elementos reguladores tal como, por ejemplo, una terminación de tal manera que cada uno de los elementos reguladores es capaz de cumplir a cabalidad su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácidos nucleicos, dependiendo de la configuración de las secuencias de ácidos nucleicos para dar el ARN sentido o antisentido. Un enlace directo en el sentido químico no es absolutamente necesario para este. Las secuencias control genéticas tal como, por ejemplo, secuencias control también son capaces de aplicar su función a partir de las posiciones remotas o aún de otras moléculas de ADN en la secuencia diana. Las configuraciones preferidas son aquellas en las cuales la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente se sitúa detrás de la secuencia que actúa como promotor, así que las dos secuencias se unen covalentemente juntas. En esta conexión, la distancia entre la secuencia promotor y la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente es preferiblemente menos de 200 pares de bases, se prefiere particularmente menos de 100 pares de bases, se prefiere muy particularmente menos de 50 pares de bases.

La producción de un enlace funcional se puede lograr utilizando técnicas de recombinación y clonación convencionales según lo descrito por ejemplo en Maniatis T *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. and in Silhavy T J *et al.* (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. y en Ausubel F M *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience. Sin embargo, otras secuencias que tienen por ejemplo la función de un enlace con sitios de división de enzima de restricción particular o de un péptido único también se puede situar entre las dos secuencias. La inserción de las secuencias también puede conducir a la expresión de proteínas de fusión.

El término secuencias control genéticas debe ser entendido en general y significa todas las secuencias que tienen una influencia en proporcionar la existencia de la función del casete de expresión transgénica de la invención. Las secuencias control genéticas modifican por ejemplo la transcripción y traducción en organismos procariontas o eucariontas. Los casetes de expresión de la invención preferiblemente abarcan como secuencia control genética adicional uno de los promotores de la invención en dirección 5' de la secuencia particular de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente, y una secuencia de terminación en dirección 3', y si es apropiado otros elementos reguladores comunes, en cada caso funcionalmente ligados a la secuencia de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente.

Las secuencias control genéticas también comprenden además promotores, elementos promotores o promotores mínimos que son capaces de modificar las propiedades que controlan la expresión. Es posible de esta manera por ejemplo a través de las secuencias control genéticas para la expresión de tejido específico tomar lugar además en dependencia de factores de estrés particular. Los elementos correspondientes se describen por ejemplo por estrés hídrico, ácido abscísico (Lam E y Chua N H, (1991) *J Biol Chem* 266(26):17131-17135) y estrés por calor (Schoff F *et al.* (1989) *Mol Gen Genetics* 217(2-3):246-53).

Una posibilidad adicional es para otros promotores que hacen posible la expresión en más tejidos vegetales o en otros organismos tal como, por ejemplo, bacteria *E. coli* que se une funcionalmente a la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa. Apropriados promotores de plantas son en principio todos los promotores descritos arriba. Es concebible por ejemplo que una secuencia de ácidos nucleicos particular se describe por un promotor (por ejemplo uno de los promotores de la invención) en un tejido vegetal como ARN sentido y se traduce en la proteína correspondiente, mientras la misma secuencia de ácidos nucleicos se transcribe por otro promotor con una diferente especificidad en un tejido diferente en ARN antisentido, y la proteína correspondiente inhibe la expresión. Esto se puede implementar por un casete de expresión de la invención por el promotor que se sitúa delante de la secuencia de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente, y el otro promotor detrás.

Las secuencias control genéticas además comprenden también la región 5'-no traducida, intrones o la región 3' no codificada de los genes, preferiblemente del gen pFD y/o del gen OASTL. Se ha mostrado que las regiones no traducidas pueden jugar una función significativa en la regulación de la expresión del gen. Así, se ha demostrado que las secuencias 5'-no traducidas pueden mejorar la expresión transitoria de genes heterólogos. Pueden además promover la especificidad del tejido (Rouster J *et al.* (1998) Plant J. 15:435-440.). Inversamente, la región 5'-no traducida del gen opaco-2 suprime la expresión. La delección de la región correspondiente conduce a un incremento en la actividad del gen (Lohmer S *et al.* (1993) Plant Cell 5:65-73). La secuencia de ácidos nucleicos indicada bajo SEQ ID NO: 2 comprende el segmento del gen FD y del gen OASTL que representa el promotor y la región 5'-no traducida hasta el codón inicial ATG de la proteína respectiva. Un intrón esta presente en la región 5' no traducida del gen OASTL, como se puede comprobar por la estructura de los clones de cADN. Los límites del intrón se localizan a 14 bp (lado 3' del intrón) y 281 bp (lado 5' del intrón). La numeración de los pares de bases correspondientes a la numeración del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 2. El intrón tiene una fuerte función que promueve la expresión en ambas direcciones de la transcripción. La razón de esto podría ser la existencia de un mejorador en esta región.

En una modalidad preferida, por consecuencia, el promotor bidireccional de la invención se describe por la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 o por las secuencias que tienen una identidad de al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, se prefiere particularmente al menos 95%, se prefiere muy particularmente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2.

Otras secuencias 5'-no traducidas e intrones con la función que promueve la expresión son conocidos por los trabajadores expertos. McElroy y coworkers (McElroy *et al.* (1991) Mol Gen Genet 231(1):150-160) reportaron en una construcción basado en el promotor actina 1 (Act1) del arroz para transformar las plantas monocotiledóneas. El uso del intrón Act1 en combinación con el promotor 35S en células de arroz transgénico conduce a un índice de expresión que se incrementó diez-veces comparado con el promotor 35S aislado. La optimización del ambiente de la secuencia del sitio de iniciación de la traducción del gen indicador (GUS) resultó en un incremento de cuatro-veces en la expresión GUS en las células de arroz transformadas. La combinación del sitio de iniciación de la traducción optimizada y del intrón Act1 resultó en un incremento de 40-veces en la expresión GUS por el promotor CaMV 35S en las células de arroz transformadas; resultados similares se han obtenido con células de maíz transformadas. Total, se concluyó de las investigaciones descritas arriba, que los vectores de expresión basadas en el promotor Act1 son apropiados para controlar la expresión suficientemente fuerte y constitutiva de ADN extraño en células de plantas monocotiledóneas transformadas.

El casete de expresión puede comprender una o más así llamadas secuencias control funcionalmente unidas al promotor, que hace posible aumentar la expresión transgénica de la secuencia de ácidos nucleicos. También es posible insertar las secuencias ventajosas adicionales, tal como otros elementos reguladores o de terminación, en el extremo 3' de las secuencias de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente. Las secuencias de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente pueden estar en una o más copias en uno de los casetes de expresión de la invención.

Las secuencias control adicionalmente significan aquellas que hacen posible la recombinación o inserción homóloga en el genoma de un organismo huésped o que permiten la delección del genoma. Es posible en la recombinación homóloga por ejemplo para el promotor natural de un gen particular que se reemplazará por uno de los promotores de la invención. Los métodos tales como la tecnología creaox permiten la delección tejido-específico, la cual es inducible en algunas circunstancias, del casete de expresión a partir del genoma del organismo huésped (Sauer B. (1998) Methods. 14(4):381-92). En este caso, secuencias flanqueantes particulares se ligan (secuencias lox) al gen diana y posteriormente se hace posible la delección por medio de recombinasa-cre.

El promotor que se introducirá se puede colocar por medio de recombinación homóloga delante del gen diana que se expresa transgénicamente ligando el promotor a las secuencias de ADN que son, por ejemplo, secuencias homólogas a endógenas que preceden el marco de lectura del gen diana. Tales secuencias se deben considerar como secuencias control genéticas. Después de que una célula ha sido transformada con la construcción de ADN apropiado, las dos secuencias homólogas pueden interactuar y de esta manera colocar la secuencia promotor en el sitio deseado delante del gen diana, así que la secuencia promotor ahora se une funcionalmente al gen diana y forma un casete de expresión de la invención. La selección de las secuencias homólogas determina el sitio de la inserción del promotor. Es posible en este caso que el casete de expresión sea generado por recombinación homóloga por medio de recombinación recíproca sencilla o doble. En la recombinación recíproca sencilla hay uso de solamente una secuencia de recombinación sencilla, y se inserta el ADN introducido completo. En la recombinación recíproca doble el ADN que se introduce se flanquea por dos secuencias homólogas, y la región flanqueante se inserta. El último proceso es apropiado para reemplazar, según lo descrito arriba, el promotor natural de un gen particular por uno de los promotores de la invención y

de esta manera modificar la localización y medir el tiempo de la expresión del gen. Este enlace funcional representa un casete de expresión de la invención.

Para seleccionar con éxito las células recombinadas homológamente o transformadas de otra manera es generalmente necesario además introducir un marcador seleccionable. Varios marcadores apropiados se mencionan abajo. El marcador de selección permite la selección de transformadas de células no transformadas. La recombinación homóloga es un evento relativamente raro en eucariotas superiores, especialmente en plantas. Las integraciones al azar en el genoma huésped predominante. Una posibilidad de delección de secuencias integradas aleatoriamente y de esta manera enriquecer los clones celulares que tienen una recombinación homóloga correcta consiste en usar un sistema de recombinación secuencia-específica según lo descrito en la Patente U.S. No. 6,110,736.

Las señales de poliadenilación apropiadas como secuencias control son señales de poliadenilación vegetal y - preferiblemente - aquellas a partir del *Agrobacterium tumefaciens*. En una modalidad preferida particularmente, el casete de expresión comprende una secuencia de terminación que es funcional en las plantas. Las secuencias de terminación que son funcionales en plantas significan en general secuencias capaces de producir la terminación de la transcripción de una secuencia de ADN en plantas. Ejemplos de secuencias de terminación apropiadas son la terminación OCS (oc-topina sintasa) y la terminación NOS (nopalina sintasa). Sin embargo, se prefieren particularmente las secuencias de terminación de plantas. Las secuencias de terminación de plantas significan en general secuencias que son un constituyente de un gen vegetal natural. Se da particular preferencia a este respecto a la terminación del gen inhibidor catepsina D de la patata (GenBank Acc. No.: X74985) o de la terminación del gen de la proteína del almacenamiento de alubia de campo VFLEIB3 (GenBank Acc. No.: Z26489). Estas terminaciones son al menos equivalentes a las terminaciones virales o T-ADN descritas en el oficio.

El trabajador experto está consciente de un gran número de ácidos nucleicos y proteínas cuya expresión recombinante es ventajosa bajo el control de los casetes de expresión o los procesos de la invención. Los trabajadores expertos adicionalmente están conscientes de una gran cantidad de genes a través de cuya represión o cambio completo por medio de la expresión de un ARN antisentido apropiado es posible así mismo lograr efectos ventajosos. Ejemplos no-restrictivos de efectos ventajosos que pueden ser mencionados son:

- facilitar la producción de un organismo transgénico por ejemplo a través de la expresión de marcadores de selección

- lograr la resistencia a factores de estrés abiótico (calor, frío, aridez, incremento de la humedad, toxinas ambientales, radiación UV)

- lograr la resistencia a factores de estrés bióticos (patógenos, virus, insectos y enfermedades)

- mejora de las propiedades en alimento humano o animal

- mejora en la velocidad de crecimiento de la producción.

Algunos ejemplos de ácidos nucleicos cuya expresión proporciona los deseados efectos ventajosos se pueden mencionar abajo:

1. Marcadores de Selección

El marcador de selección abarca los marcadores de selección positivos que confieren resistencia a un antibiótico, herbicida o biocida, y los marcadores de selección negativos que confieren sensibilidad al último exactamente, y los marcadores que proporcionan los organismos transformados con una ventaja de crecimiento (por ejemplo a través de expresión de genes clave de la biosíntesis de la citoquina; Ebinuma H *et al.* (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121). En el caso de selección positiva, solamente prosperan los organismos que expresan el correspondiente marcador de selección, mientras que en el caso de selección negativa es precisamente estos los que perecen. El uso de un marcador de selección positivo es preferido en la producción de plantas transgénicas. Adicionalmente se prefiere utilizar marcadores de selección que confieren ventajas en el crecimiento. Los marcadores de selección negativos se pueden utilizar ventajosamente si la intención es suprimir los genes particulares o secciones del genoma de un organismo (por ejemplo como parte de un proceso de cruzamiento).

El marcador seleccionable introducido con el casete de expresión confiere resistencia a un biocida (por ejemplo un herbicida tal como fosfotricina, glifosato o bromoxinilo), un inhibidor de metabolismo tal como 2-deoxiglucosa 6-fosfato (WO 98/45456) o un antibiótico tal como, por ejemplo, kanamicina, G 418, bleomicina, higromicina, en las células recombinadas o transformadas con éxito. El marcador de selección permite la selección de células transformadas a partir de células transformadas de no transformadas (McCormick *et al.* (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Los marcadores de selección preferidos particularmente son aquellos que confieren resistencia a los herbicidas. El trabajador experto es consciente de numerosos marcadores de selección de este tipo y las secuencias codificadas por estos. Los ejemplos no-restrictivos se pueden mencionar abajo:

i) *Marcadores de Selección Positivos*

El marcador seleccionable introducido con el casete de expresión confiere resistencia a un biocida (por ejemplo un herbicida tal como fosfinotricina, glifosato o bromoxinilo), un inhibidor de metabolismo tal como 2-deoxiglucosa 6-fosfato (WO 98/45456) o un antibiótico tal como, por ejemplo, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, G 418, neomicina, bleomicina o higromicina, en las células transformadas con éxito. El marcador de selección permite la selección de células transformadas a partir de no transformadas (McCormick *et al.* (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Los marcadores de selección preferidos particularmente son aquellos que confieren resistencia a los herbicidas. Ejemplos de marcadores de selección que pueden ser mencionados son:

- secuencias de ADN que se codifican por fosfinotricina acetiltransferasas (PAT; también llamado gen de resistencia bialfos (bar)) y producen desintoxicación del herbicida fosfinotricina (PPT) (de Block *et al.* (1987) EMBO J 6:2513-2518). Apropriados genes bar se pueden aislar de, por ejemplo, *Streptomyces hygroscopicus* o *S. viridochromogenes*. Las secuencias correspondientes son conocidas por trabajadores expertos (GenBank Acc. No.: X17220, X05822, M22827, X65195; Patente U.S. No. 5,489,520). También se describen los genes sintéticos por ejemplo para la expresión en plastidios AJ028212. Un gen Pat sintético se describe en Becker *et al.* (1994) Plant J 5:299-307. Los genes confieren resistencia al herbicida bialfos y son un marcador ampliamente usado en plantas transgénicas (Vickers J E *et al.* (1996) Plant Mol Biol Rep 14:363-368; Thompson C J *et al.* (1987) EMBO J 6:2519-2523).

- Los genes 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (genes EPSP sintasa) que confieren resistencia al glifosato (N-(fosfometil) glicina) (Steinrucken H C *et al.* (1980) Biochem Biophys Res Commun 94:1207-1212; Levin J G y Sprinson D B (1964) J Biol Chem 239:1142-1150; Cole D J (1985) Mode of action of glyphosate; A literature analysis, p. 48-74. In: Grossbard E and Atkinson D (eds.). El herbicida glifosato. Butterworths, Boston.). Las variantes de la tolerancia del glifosato EPSPS se utilizan preferiblemente como marcadores de selección (Padgett S R *et al.* (1996). Nuevas oportunidades de control de maleza: desarrollo de soja con un gen Roundup Ready.TM. En: Herbicide Resistant Crops (Duke S O ed.), pp. 53-84. CRC Press, Boca Raton, Fla.; Saroha M K und Malik V S (1998) J Plant Biochem Biotechnol 7:65-72). El gen EPSPS de la cepa CP4 del *Agrobacterium* sp. tiene una tolerancia al glifosato natural que se puede transferir a plantas transgénicas apropiadas (Padgett S R *et al.* (1995) Crop Science 35(5):1451-1461). Las 5-Enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasas que son tolerantes al glifosato se describen por ejemplo en la Patente U.S. No. 5,510,471; Patente U.S. No. 5,776,760; Patente U.S. No. 5,864,425; Patente U.S. No. 5,633,435; Patente U.S. No. 5,627,061; Patente U.S. No. 5,463,175; EP 0 218 57 Otras secuencias se describen bajo GenBank Accession X63374. Adicionalmente se prefiere el gen aroA (MI 0947).

- el gen gox (óxido reductasa glifosato de *Achromobacter* sp.) codificado por las enzimas que degradan el glifosato. GOX puede conferir resistencia al glifosato (Padgett S R *et al.* (1996) J Nutr. 126(3):702-16; Shah D *et al.* (1986) Science 233: 478-481).

- el gen deh (codificado por una dehalogenasa que inactiva el dalapon), (GenBank Acc. No.: AX022822, AX022820 y WO99/27116)

- los genes bxn que se codifican por las enzimas nitrilasa que degradan el bromoxinilo. Por ejemplo la nitrilasa de *Klebsiella ozananae*. Las secuencias deben ser encontradas en GenBank por ejemplo bajo el Acc. No: E01313 y J03196.

- neomicina fosfotransferasas confieren resistencia a los antibióticos (aminoglicósidos) tal como neomicina, G418, higromicina, paromomicina o kanamicina reduciendo su efecto de inhibición a través de una reacción de fosforilación. El gen nptII se prefiere particularmente. Las secuencias se pueden obtener del GenBank (AF080390 minitransposon mTn5-GNm; AF080389 minitransposon mTn5-Nm, secuencia completa). Además, el gen ya es un componente de numerosos vectores de expresión y se puede aislar de estos utilizando los procesos familiares a los trabajadores expertos (tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa) (AF234316 pCAMBIA-2301; AF234315 pCAMBIA-2300, AF234314 pCAMBIA-2201). El gen NPTII codifica para una aminoglicosido 3'O-fosfotransferasa de la *E. coli*, Tn5 (GenBank Acc. No: U00004 Posición 1401-2300; Beck *et al.* (1982) Gene 19 327-336).

- el gen DOG^R El gen DOG^R 1 se aisló de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (EP 0 807 836). Codificado por una 2-deoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa que confiere resistencia al 2-DÓG (Randez-Gil *et al.* 1995, Yeast 11, 1233-1240; Sanz *et al.* (1994) Yeast 10:1195-1202, secuencia: GenBank Acc. No.: NC001140 cromosoma VIII, *Saccharomyces cerevisiae* position 194799-194056).

- acetolactato sintasas que inactivan la sulfonilurea - e imidazolinona- que confieren resistencia a los herbicidas imidazolinona/sulfonilurea. Apropriados ejemplos son las secuencias depositadas bajo GenBank Acc No.: X51514 para el gen *Arabidopsis thaliana* Csr 2 (EC 4.3.18) (Sathasivan K *et al.* (1990) Nucleic Acids Res. 18(8):2188). Las acetolactato sintasas que confieren resistencia a los herbicidas de imidazolinona también se describen bajo GenBank Acc. No.: AB049823, AF094326, X07645, X07644, A19547, A19546, A19545, I05376, I05373, AL133315.

- higromicina fosfotransferasas (X74325 gen *P. pseudomallei* para higromicina fosfotransferasa) que confieren resistencia al antibiótico higromicina. El gen es un constituyente de numerosos vectores de expresión y se puede aislar de estos utilizando procesos familiares a los trabajadores expertos (tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la po-

ES 2 289 529 T3

limerasa) (AF294981 pINDEX4; AF234301 pCAMBIA-1380; AF234300 pCAMBIA-1304; AF234299 pCAMBIA-1303; AF234298 pCAMBIA-1302; AF354046 pCAMBIA-1305; AF354045 pCAMBIA-1305.1)

- Genes de resistencia para

a) cloramfenicol (cloramfenicol acetiltransferasa),

b) tetraciclina, varios genes de resistencia se describen, por ejemplo Genes tetA y tetR de ordonez X65876 S. clase D para la resistencia a la tetraciclina y el gen de resistencia a la tetraciclina de las proteínas represor X51366 *Bacillus cereus* plasmid pBC16. Además, el gen ya es un constituyente de numerosos vectores de expresión y se puede aislar de estos utilizando procesos familiares a los trabajadores expertos (tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa)

c) estreptomicina, varios genes de resistencia se describen, por ejemplo con el gen de la hormiga *Corynebacterium acetoacidophilum* GenBank Acc. No.: AJ278607 para estreptomicina adenililtransferasa.

d) zeocina, el correspondiente gen de resistencia es un constituyente de numerosos vectores de clonación (por ejemplo L36849 clonación vector pZEO) y se puede aislar de estos utilizando procesos familiares a los trabajadores expertos (tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa).

e) ampicilina (gen β -lactamasa; Datta N, Richmond M H. (1966) *Biochem J.* 98(1):204-9; Heffron F *et al* (1975) *J. Bacteriol* 122: 250-256; el gen Amp primero fue clonado para preparar el vector de *E. coli* pBR322; Bolivar F *et al.* (1977) *Gene* 2:95-114). La secuencia es un constituyente de numerosos vectores de clonación y se puede aislar de estos utilizando procesos familiares a los trabajadores expertos (tal como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa).

- Los genes tal como la isopenicilina transferasa del *Agrobacterium tumefaciens* (cepa:PO22) (Genbank Acc. No.: AB025109). El gen *ipt* es una enzima clave en la biosíntesis de la citoquina. La sobre expresión de estos facilita la regeneración de plantas (por ejemplo selección en medio libre de citoquina). El proceso para utilizar el gen *ipt* se describe (Ebinuma H *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2117-2121; Ebinuma H *et al.* (2000) Selección de las plantas transgénicas libres de marcador utilizando los onco-genes (*ipt*, rol A, B, C) del *Agrobacterium* como marcadores seleccionables, In *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers).

Varios otros marcadores de selección positivos que confieren una ventaja de crecimiento en las plantas transformadas comparadas con las no transformadas, y los procesos para su uso se describen *inter alia* en EP-A 0 601 092. Ejemplos que podrían ser mencionados son β -glucuronidasa (en conjunción con, por ejemplo, citoquinina glucoronida), manosa-6-fosfato isomerasa (en conjunción con manosa), UDP-galactosa 4-epimerasa (en conjunción con, por ejemplo, galactosa), con la preferencia particular para manosa-6-fosfato isomerasa en conjunción con manosa.

ii) *Marcadores de Selección Negativos*

Los marcadores de selección negativos permiten por ejemplo seleccionar organismos con secuencias suprimidas con éxito que contienen el gen marcador (Koprek T *et al.* (1999) *Plant J* 19(6):719-726). En el caso de selección negativa, por ejemplo un compuesto que no tiene de otra manera ningún efecto desventajoso para la planta se convierte en un compuesto que tiene un efecto desventajoso por el marcador de selección negativo introducido en la planta. También son apropiados los genes que *per se* tienen un efecto desventajoso, tales como, por ejemplo, timidina quinasa (TK), fragmento toxina A de difteria (DT-A), el producto del gen *codA* codificado por una citosina deaminasa (Gleave A P *et al.* (1999) *Plant Mol Biol.* 40(2):223-35; Perera R J *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol* 23(4): 793-799; Stougaard J (1993) *Plant J* 3:755-761), el gen P450citocromo (Koprek *et al.* (1999) *Plant J* 16:719-726), los genes codificados por un haloalcano dehalogenasa (Naested H (1999) *Plant J* 18:571-576), el gen *iaaH* (Sundaresan V *et al.* (1995) *Genes & Development* 9:1797-1810) o el gen *tms2* (Fedoroff N V & Smith D L (1993) *Plant J* 3:273-289).

Las concentraciones usadas en cada caso para la selección de antibióticos, herbicidas, biocidas o toxinas se deben adaptar a las condiciones u organismos particulares de la prueba. Ejemplos que se pueden mencionar para las plantas son kanamicina (Km) 50 mgA, higromicina B 40 mg/l, fosfotricina (ppt) 6 mgA.

También es posible expresar análogos funcionales de dichos ácidos nucleicos codificados por marcadores de selección. Los análogos funcionales significan a este respecto todas las secuencias que tienen sustancialmente la misma función, i.e. son capaces de seleccionar organismos transformados. Es además perfectamente posible para el análogo funcional diferir en otras características. Puede por ejemplo tener una actividad mayor o menor o de otra manera poseer otras funcionalidades.

2. Protección mejorada de la planta contra factores de estrés abióticos tal como aridez, calor, o frío por ejemplo a través de sobre expresión de polipéptidos anticongelantes del *Myoxocephalus Scorpius* (WO 00/00512), *Myoxocephalus octodecemspinosus*, el activador de transcripción CBF1 de *Arabidopsis thaliana*, glutamato dehidrogenasas (WO 97/12983, WO 98/11240), dependientes de los genes de calcio proteína quinasa (WO 98/26045), calcineurinas (WO 99/05902), farnesiltransferasas (WO 99/06580), Pei Z M *et al.*, *Science* 1998, 282: 287-290), ferritina (Deak M *et al.*, *Nature Biotechnology* 1999, 17:192-196), oxalato oxidasa (WO 99/04013; Dunwell J M *Biotechnology y Genetic*

ES 2 289 529 T3

Engineering Reviews 1998, 15:1-32), factor DREB1A (dehydration response elemento B 1A; Kasuga M *et al.*, Nature Biotechnology 1999, 17:276-286), genes de manitol o síntesis de trehalosa tal como trehalosa-fosfato sintasa o trehalosa-fosfato fosfatasa (WO 97/42326), o inhibición de los genes tal como de trehalasa (WO 97/50561). Los ácidos nucleicos preferidos particularmente son aquellos codificados por el activador transcripcional CBF1 a partir del *Ara-*
5 *bidopsis thaliana* (GenBank Acc. No.: U77378) de la proteína anticongelante del *Myoxocephalus octodecemspinus* (GenBank Acc. No.: AF306348) o equivalentes funcionales de estos.

3. Expresión de enzimas metabólicas para utilizar en los sectores de alimento animal y humano, por ejemplo la expresión de fitasa y celulasas. Se da particular preferencia a los ácidos nucleicos tal como el cADN artificial
10 codificado por un fitasa microbiana (GenBank Acc. No.: A19451) o equivalentes funcionales de estos.

4. Lograr la resistencia por ejemplo a hongos, insectos, nematodos y enfermedades a través de la secreción o acumulación dirigida de metabolitos o proteínas particulares en la epidermis del embrión. Ejemplos que pueden ser
15 la pared celular de los parásitos, las proteínas que inactivan los ribosomas (RIPs) y otras proteínas de la resistencia de las plantas y respuestas de estrés, como se inducen en lesión o ataque microbiano de plantas o químicamente por, por ejemplo, ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno, lisozimas a partir de fuentes no-vegetales tal como, por ejemplo, lisozima T4 o lisozima de varios mamíferos, proteínas insecticidas tal como endotoxina del *Bacillus thuringiensis*, inhibidor α -amilasa o inhibidores de proteasa (inhibidor tripsina cowpea), glucanasas, lecitinas tal como fitohema-
20 glutinina, aglutinina de germen de trigo, RNAsas o ribozimas. Los ácidos nucleicos preferidos particularmente son aquellos codificados por la endoquitinasa chit42 a partir del *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc. No.: S78423) o para la N-hidroxilación, proteínas (CYP79) P-450 citocromo multifuncionales a partir del Sorgo bicolor (GenBank Acc. No.: U32624) o equivalentes funcionales de estos.

5. La acumulación de glucosinolatos en plantas del género Cardales, especialmente las semillas de aceite para proteger de las plagas (Rask L *et al.* (2000) Plant Mol Biol 42:93-113; Menard R *et al.* (1999) Phytochemistry 52:29-
35), la expresión de la endotoxina *Bacillus thuringiensis* bajo el control del promotor 35S CaMV (Vaeck *et al.* (1987) Nature 328:33-37) o protección del tabaco contra el ataque de hongos por expresión de una quitinasa de alubia bajo el control del promotor CaMV (Broglie *et al.* (1991) Science 254:1194-119, se conoce.
25

La expresión de los genes cryIA(b) y cryIA(c) sintéticos que se codifican por el lepidoptera-específico delta-endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* puede producir resistencia a plagas de insectos en varias plantas. Así, es posible lograr la resistencia en arroz a dos de las principales plagas del arroz, el barrenador rayado del tallo (*Chilo suppressalis*) y el barrenador amarillo del tallo (*Scirpophaga incertulas*) (Cheng X *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(6):2767-
30 2772; Nayak P *et al.* (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2111-2116).

5. Expresión de genes que producen la acumulación de productos químicos finos tal como de tocoferoles, tocotrienoles o carotenos. Un ejemplo que puede ser mencionado es fitoeno desaturasa. Los ácidos nucleicos que se codifican por la fitoeno desaturasa del *Narcissus pseudonarcissus* (GenBank Acc. No.: X78815) o se prefieren equivalentes
40 funcionales de estos.

6. Producción de nutracéuticos tal como, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados tal como, por ejemplo, ácido araquidónico o EP (ácido eicosapentaenoico) o DHA (ácido docosahexaenoico) por expresión de elongasas y/o desaturasas de ácidos grasos o producción de proteínas que tienen un valor nutricional mejorado tal como, por ejemplo,
45 que tienen un alto contenido de amionoácidos esenciales (por ejemplo el gen de albúmina 2S rico en metionina de la nuez del Brasil). Los ácidos nucleicos preferidos son aquellos que se codifican por el albúmina 2S rico en metionina a partir del *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc. No.: AB044391), la $\Delta 6$ -acillipid desaturasa del *Physcomitrella patens* (GenBank Acc. No.: AJ222980; Girke *et al.* (1998) Plant J 15:3948), la $\Delta 6$ -desaturasa del *Mortierella alpina* (Sakuradani *et al.* (1999) Gene 238:445-453), la $\Delta 5$ -desaturasa del *Caenorhabditis elegans* (Michaelson *et al.* 1998, FEBS Letters 439:215-218), la $\Delta 5$ -ácido graso desaturasa (des-5) del *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc. No.: AF078796), la $\Delta 5$ -desaturasa del *Mortierella alpina* (Michaelson *et al.* J Biol Chem 273:19055-19059), la $\Delta 6$ -elongasa del *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin *et al.* (2000) Proc Natl. Acad Sci USA 97:6421-6426), la $\Delta 6$ -elongasa del *Physcomitrella patens* (Zank *et al.* (2000) Biochemical Society Transactions 28:654-657) o equivalentes funcionales de estos.
50
55

7. Producción de productos químicos finos (tal como, por ejemplo, enzimas) y farmacéuticos (tal como, por ejemplo, anticuerpos o vacunas según lo descrito en Hood E E, Jilka J M. (1999) Curr Opin Biotechnol. 10(4):382-6; Ma J K, Vine N D (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92). Ha sido posible por ejemplo producir avidina recombinante del huevo de gallina blanco y β -glucuronidasa bacteriana (GUS) a gran escala en plantas transgénicas de maíz (Hood *et al.* (1999) Adv Exp Med Biol 464:127-47). Estas proteínas recombinantes de las plantas de maíz se comercializan como productos bioquímicos de alta pureza por Sigma Chemicals Co.
60

8. Lograr un incremento de habilidad de almacenamiento en células que normalmente contienen pocas proteínas o lípidos de almacenamiento con el propósito de aumentar la producción de estas sustancias, por ejemplo por la expresión de una acetil-CoA carboxilasa. Los ácidos nucleicos preferidos son aquellos que se codifican por la acetil-CoA carboxilasa (accase) del *Medicago sativa* (GenBank Acc. No.: L25042) o equivalentes funcionales de estos.
65

ES 2 289 529 T3

Otros ejemplos de genes ventajosos se mencionan por ejemplo en Dunwell J M (2000) J Exp Bot. 51 Spec No: 487-96.

5 También es posible expresar análogos funcionales de dichos ácidos nucleicos y proteínas. Los análogos funcionales significan a este respecto todas las secuencias que tienen sustancialmente la misma función, i.e. son capaces de la función (por ejemplo una conversión del sustrato o la transducción señal) como la mencionada proteína por medio de ejemplo también. Además es perfectamente posible para el análogo funcional diferir en otras características. Puede tener por ejemplo una actividad superior o inferior o de otra manera poseer otras funcionalidades. Los análogos funcionales también significan secuencias que se codifican para las proteínas de fusión que consisten de una de las 10 proteínas preferidas y otras proteínas, por ejemplo una proteína preferida adicional o de otra manera una secuencia de péptido señal.

La expresión de los ácidos nucleicos bajo el control de los promotores de la invención es posible en cualquier compartimiento celular deseado tal como, por ejemplo, el sistema de endomembrana, la vacuola y los cloroplastos. 15 Las reacciones de glicosilación, especialmente plegamientos y similares, son posibles utilizando la ruta secretora. La secreción de la proteína diana en la superficie celular o secreción en el medio de cultivo, por ejemplo en el uso de células o protoplastos cultivadas en suspensión, también es posible. Las secuencias diana necesarias para este propósito se pueden considerar de esta manera en variaciones del vector individual y ser introducidas, junto con el gen diana que se clonarán, en el vector a través del uso de una apropiada estrategia de clonación. Es posible utilizar 20 como secuencias diana tanto el gen-intrínseco, donde este presente, como secuencias heterólogas. Las secuencias heterólogas adicionales que se prefieren para el enlace funcional, pero no restringido a este, son secuencias diana adicionales para asegurar la localización subcelular en apoplastos, en la vacuola, en plastidios, en la mitocondria, en el retículo endoplasmático (ER), en el núcleo celular, en elaioplastos u otros compartimientos; y mejoradores de la traducción tal como la secuencia líder 5' del virus del mosaico del tabaco (Gallie *et al.* (1987) Nucl Acids Res 25 15 8693-8711) y similares. Se describe el proceso para las proteínas de transporte que no se localizan *per se* en los plastidios de una manera dirigida en los plastidios (Klosgen R B & Weil J H (1991) Mol Gen Genet 225(2):297-304; Van Breusegem F *et al.* (1998) Plant Mol Biol 38(3):491-496). Las secuencias preferidas son:

- a) subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-bisfosfato carboxilasa (Rubisco ssu) a partir del guisante, maíz, girasol 30
- b) los péptidos de tránsito derivados de genes de la biosíntesis de ácido graso vegetal tal como el péptido de tránsito de la proteína transportadora acil plastídica (ACP), la estearil-ACP desaturasa, β -cetoacil-ACP sintasa o la acil-ACP tioesterasa
- c) el péptido de tránsito para GBSSI (gránulo de almidón unido al almidón sintasa 1) 35
- d) genes LHCP II.

Las secuencias diana se pueden unir a otras secuencias diana que difieren de las secuencias que codifican el péptido 40 de tránsito con el fin de asegurar una localización subcelular en el apoplasto, en la vacuola, en plastidios, en la mitocondria, en el retículo endoplasmático (ER), en el núcleo celular, en elaioplastos u otros compartimientos. También es posible emplear mejoradores de traducción tal como la secuencia líder 5' del virus del mosaico del tabaco (Gallie *et al.* (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) y similares.

45 El trabajador experto también es consciente que no necesita expresar los genes descritos arriba directamente por el uso de las secuencias de ácidos nucleicos codificadas por estos genes, ni reprimirlos por ejemplo por anti-sentido. También puede utilizar por ejemplo factores de transcripción artificial del tipo de proteínas con dedo de cinc (Beerli R R *et al.* (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-500). Estos factores unidos en las regiones reguladoras de los genes endógenos que se expresan o reprimen y resultan, dependiendo del diseño del factor, en la expresión o represión 50 del gen endógeno. Así, los efectos deseados también se pueden lograr por la expresión de un factor apropiado de la transcripción del dedo de cinc bajo el control de uno de los promotores de la invención.

Los casetes de expresión de la invención se pueden emplear además para suprimir o reducir la replicación o/y 55 traducción de los genes diana por el silenciador génico.

Los casetes de expresión de la invención también se pueden emplear para expresar los ácidos nucleicos que median los así llamados efectos antisentido y son de esta manera capaces por ejemplo de reducir la expresión de una proteína 60 diana.

A modo de ejemplo, los genes y proteínas preferidos, cuya supresión es la condición para un fenotipo ventajoso comprenden, pero no restrictivamente:

a) poligalacturonasa para prevenir la degradación celular y sensibilidad de plantas y frutas, tomates por ejemplo. Preferiblemente se utilizan para este propósito las secuencias de ácidos nucleicos tal como aquellas del gen de poliga- 65 lacturonasa del tomate (GenBank Acc. No.: X14074) o sus homólogos de otros géneros y especies.

b) reducción en la expresión de proteínas alergénicas según lo descrito por ejemplo en Tada Y *et al.* (1996) FEBS Lett 391(3):341-345 o Nakamura R (1996) Biosci Biotechnol Biochem 60(8):1215-122

c) cambio del color de flores por supresión de la expresión de enzimas de biosíntesis antociana. Los procedimientos correspondientes se describen (por ejemplo en Forkmann G, Martens S. (2001) *Curr Opin Biotechnol* 12(2):155-160). Preferiblemente se utilizan para este propósito las secuencias de ácidos nucleicos como aquellas de la flavonoido 3'-hidroxilasa (GenBank Acc. No.: AB045593), de la dihidroflavanol 4-reductasa (GenBank Acc. No.: AF017451), de chalcona isomerasa (GenBank Acc. No.: AF276302), de chalcona sintasa (GenBank Acc. No.: AB061022), de flavonona 3-beta-hidroxilasa (GenBank Acc. No.: X72592) o de flavona sintasa II (GenBank Acc. No.: AB045592) o sus homólogos de otros géneros y especies.

d) cambio del contenido amilosa/amilopectina en almidón por supresión de la enzima Q de ramificación que es responsable del enlace α -1,6-glicosídico. Los procedimientos correspondientes se describen (por ejemplo en Schwall G P *et al.* (2000) *Nat Biotechnol* 18(5):551-554). Preferiblemente se utilizan para este propósito las secuencias de ácidos nucleicos como aquellas del almidón de la enzima II de ramificación de patata (GenBank Acc. No.: AR123356; Patente U.S. No. 6,169,226) o sus homólogos de otros géneros y especies.

Un ácido nucleico "antisentido" significa en primer lugar una secuencia de ácidos nucleicos que es total o parcialmente complementaria a al menos parte de la cadena sentido de dicha proteína diana. El trabajador experto es consciente que puede utilizar alternativamente el cADN o el gen correspondiente como plantilla inicial para las construcciones antisentido correspondientes. El ácido nucleico antisentido es preferiblemente complementario a la región codificada de la proteína diana o una parte de este. El ácido nucleico antisentido puede, sin embargo, también ser complementario a la región no-codificada de una parte de estos. Iniciando de la información de la secuencia para una proteína diana, un ácido nucleico antisentido se puede diseñar de una manera familiar a los trabajadores expertos teniendo en consideración las reglas de par de bases de Watson y Crick. Un ácido nucleico antisentido puede ser complementario al total o una parte de la secuencia de ácidos nucleicos de una proteína diana. En una modalidad preferida, el ácido nucleico antisentido es un oligonucleótido con una longitud de por ejemplo 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos.

En una modalidad preferida, el ácido nucleico antisentido comprende las moléculas α -anoméricas del ácido nucleico. Las moléculas α -anoméricas del ácido nucleico forma en particular híbridos bicatenarios con ARN complementario en las cuales las cadenas corren paralelo una a la otra, en contraste a las unidades β normales (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641). El uso de las secuencias descritas arriba en el sentido de orientación se abarca así mismo y puede, como es familiar a los trabajadores expertos, conducir a la co-supresión. La expresión de ARN sentido a un gen endógeno puede reducir o cambiar completamente su expresión, similar a aquellos descritos para estrategias antisentido (Goring *et al.* (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1770-1774; Smith *et al.* (1990) *Mol Gen Genet* 224:447-481; Napoli *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:279-289; Van der Krol *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:291-299). Es por otra parte para que la construcción introducida represente el gen que se reducirá completamente o solo en parte. La posibilidad de traducción es innecesaria.

También se prefiere muy particularmente utilizar los procesos tal como regulación del gen por medio de ARN bicatenario (interferencia de ARN bicatenario). Los procesos correspondientes son conocidos a los trabajadores expertos y descritos en detalle (por ejemplo Matzke M A *et al.* (2000) *Plant Mol Biol* 43:401-415; Fire A. *et al.* (1998) *Nature* 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). La referencia expresa se hace a los procesos y métodos descritos en las referencias indicadas. La supresión altamente eficiente de los genes nativos se produce aquí a través de la introducción simultánea de cadena y cadena complementaria.

Es posible y ventajoso asociar la estrategia antisentido con un proceso de ribozima. Las ribozimas son secuencias de ARN activas catalíticamente que, se asocian a las secuencias antisentido, catalíticamente dividen las secuencias diana (Tanner N K. *FEMS Microbiol Rev.* 1999; 23 (3):257-75). Esto puede incrementar la eficiencia de una estrategia antisentido. La expresión de ribozimas para reducir las proteínas particulares se conoce por los trabajadores expertos y descritos por ejemplo en EP-A1 0 291 533, EP-A1 0 321 201 y EP-A1 0 360 257. Las secuencias diana y las ribozimas apropiadas se pueden determinar según lo descrito por Steinecke (Ribozymes, *Methods in Cell Biology* 50, Galbraith *et al.* eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460) por cálculos secundarios de la estructura del ARN del ribozima y ARN diana y por la interacción de estos (Bayley C C *et al.*, *Plant Mol Biol.* 1992; 18(2):353-361; Lloyd A M y Davis R W *et al.*, *Mol Gen Genet.* 1994 March; 242(6):653-657). Ejemplos que podrían ser mencionados son ribozimas de cabeza de martillo (Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591). Las ribozimas preferidas se basan en los derivados de la tetrahimena L-19 IVS ARN (Patente U.S. No. 4,987,071; Patente U.S. No. 5,116,742). Otras ribozimas que tienen selectividad para un mARN L119 se pueden seleccionar (Bartel D y Szostak J W (1993) *Science* 261:1411-1418).

En otra modalidad, la expresión de la proteína diana se puede reducir utilizando las secuencias de ácidos nucleicos que son complementarias a los elementos reguladores de las genes de proteínas diana, forma con la última una estructura helicoidal triple y de esta manera prevenir la transcripción del gen (Helene C (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene C *et al.* (1992) *Ann NY Acad Sci* 660:27-36; Maher L J (1992) *Bioassays* 14(12):807-815).

Los promotores bidireccionales de la invención son particularmente ventajosos cuando se emplean para regular las dos enzimas de una ruta metabólica. 2'-Metil-6-fililhidroquinona metiltransferasa y homogentisato fitil-pirofosfotransferasa, por ejemplo, se pueden expresar simultáneamente vía uno de los promotores bidireccionales de la invención, causando un incremento en los tocoferoles. Además, la inhibición de homogentisato dioxigenasa (por ejemplo

ES 2 289 529 T3

por expresión de un dsARN correspondiente) y la sobre expresión de la tirosina aminotransferasa conduce a un incremento en el contenido del tocoferol. En el metabolismo carotenóide, la inhibición de α -ciclase y la sobre expresión de β -ciclase conduce a un cambio en el contenido de α -caroteno y β -caroteno.

5 Es posible prevenir los efectos silenciadores pos-transcripcionales por inhibición en paralelo de la transcripción del gen SDE3 y la sobre expresión de la proteína recombinante (WO 02/063039).

Las partes activas inmunológicamente de los anticuerpos también se pueden expresar ventajosamente utilizando los promotores de la invención. Así, por ejemplo, la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 se puede expresar en una
10 dirección, y la cadena ligera en la otra dirección. Las dos forman un anticuerpo funcional después de la traducción (WO 02/101006).

Otra posibilidad es expresar simultáneamente genes transportadores relacionados con el estrés (WO 03/057899) junto con los genes herbicidas para incrementar la tolerancia de efectos ambientales.

Muchas enzimas consisten de dos o más subunidades, ambas de las cuales son necesarias para el funcionamiento. Es posible por medio de uno de los promotores bidireccionales de la invención expresar dos subunidades simultáneamente. Un ejemplo de estos es la sobre expresión de las subunidades α y β de la hormona humana que estimula el
20 folículo.

Una construcción que consiste de un gen para un marcador de selección y un gen indicador es particularmente valiosa para establecer los sistemas de transformación, cuando se regulan por este promotor bidireccional.

Los casetes de expresión de la invención y los vectores derivados de estos pueden comprender elementos funcionales adicionales. El término elemento funcional debe ser entendido en general y significar todos los elementos que tienen una influencia en la producción, multiplicación o función de los casetes de expresión de la invención o vectores u organismos derivados de estos. Ejemplos no-restrictivos que pueden ser mencionados son:

a) *Genes indicadores*

Los genes indicadores o proteínas codificados por las proteínas fácilmente cuantificables y se garantiza vía un color intrínseco o una actividad enzimática una valoración de la eficiencia de la transformación o del sitio o tiempo de expresión (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):2944). Ejemplos que podrían ser mencionados son:

-Proteína fluorescente verde (GFP) (Chui W L *et al.*, Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel S M *et al.*, Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen *et al.* (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff *et al.* (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94 (6):2122-2127; Reichel *et al.* (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian *et al.* (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228).

- cloramfenicol transferasa (Fromm *et al.* (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5824-5828),

- luciferasa (Millar *et al.* (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414; Ow *et al.* (1986) Science, 234:856-859); permite la detección de bioluminiscencia.

- β -galactosidasa, codificada por una enzima para la cual varios sustratos cromogénicos están disponibles.

- β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson *et al.* (1987) EMBO J 6:3901-3907) o el gen uidA el cual codifica una enzima por varios sustratos cromogénicos.

- proteína del producto de gen R-locus que regula la producción de pigmentos de antocianina (coloración roja) en tejidos vegetales y de esta manera hace posible el análisis directo de la actividad del promotor sin adicionar auxiliares adicionales o sustratos cromogénicos (Dellaporta *et al.*, In: Chromosome Structure y Function: Impact de New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium 11:263-282, 1988).

- β -lactamasa (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), enzima para varios sustratos cromogénicos (por ejemplo PADAC, una cefalosporina cromogénica).

- producto del gen xyIE (Zukowsky *et al.* (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), catecol dioxigenasa, que puede convertir los catecoles cromogénicos.

- α -amilasa (Ikuta *et al.* (1990) Biol Technol. 8:241-242).

- tirosinasa (Katz *et al.* (1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), enzima que oxida la tirosina a DOPA y dopaquina que posteriormente forma la melanina fácilmente detectable.

- aequorina (Prasher *et al.* (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), se puede utilizar en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio.

ES 2 289 529 T3

b) Orígenes de la replicación que garantiza una multiplicación de los casetes o vectores de expresión de la invención en, por ejemplo, *E. coli*. Ejemplos que pueden ser mencionados son ORI (origen de la replicación de ADN), el pBR322 ori o el P15A ori (Sambrook *et al.*: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

c) Elementos por ejemplo “secuencias del borde” que hacen posible la transferencia agrobacteria-mediada en células vegetales para la transferencia e integración en el genoma vegetal, tal como, por ejemplo, el borde izquierdo o derecho de la región T-ADN o la vir.

d) Regiones de clonación múltiple (MCS) permiten y facilitan la inserción de una o más secuencias de ácidos nucleicos.

El trabajador experto es consciente de varias maneras de obtener un casete de expresión de la invención. La producción de un casete de expresión de la invención tiene lugar por ejemplo por fusión de uno de los promotores de la invención (o un equivalente funcional o parte funcionalmente equivalente según lo mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 o un equivalente funcional con una secuencia de ácidos nucleicos que se expresan, si es apropiado con una secuencia codificada por un péptido de tránsito, preferiblemente un péptido de tránsito cloroplasto-específico que se sitúa preferiblemente entre el promotor y la secuencia respectiva de ácidos nucleicos, y con una señal de terminación o poliadenilación. Las técnicas de recombinación y clonación convencionales se utilizan para este propósito (según lo descrito arriba).

Sin embargo, y el casete de expresión también significa las construcciones en las cuales el promotor, sin previamente haber sido unidos funcionalmente a una secuencia de ácidos nucleicos que se expresan, se introduce en un genoma huésped, por ejemplo vía una recombinación homóloga dirigida o una inserción al azar, aquí asume control regulador de las secuencias de ácidos nucleicos que luego se unen funcionalmente a este, y controla la expresión transgénica de estos. La inserción del promotor - por ejemplo por recombinación homóloga - delante de un ácido nucleico codificado por un polipéptido particular resulta en un casete de expresión de la invención que controla la expresión del polipéptido particular en la planta. La inserción del promotor también puede tomar lugar por la expresión de ARN antisentido al ácido nucleico codificado por un polipéptido particular. La expresión del polipéptido particular en plantas de esta manera inhibe la expresión o intercambia completamente.

También es posible análogamente para que una secuencia de ácidos nucleicos sea expresada transgénicamente para ser colocada, por ejemplo por recombinación homóloga, detrás del endógeno, promotor natural, resultando en un casete de expresión de la invención que controla la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente.

Vectores que comprenden los casetes de expresión descritos arriba también son de acuerdo con la invención. Los vectores pueden ser por ejemplo plásmidos, cosmidos, fagos, virus o de otra manera agrobacteria.

Otro aspecto de la invención se relaciona con organismos transgénicos transformados con al menos un casete de expresión de la invención o un vector de la invención, y células, cultivos celulares, tejidos, partes - tales como, por ejemplo, hojas, raíces etc. de organismos vegetales - o material de propagación derivados de tales organismos.

Organismo, huéspedes iniciales u organismos significan organismos procariotas o eucariotas tal como, por ejemplo, microorganismos u organismos vegetales. Los microorganismos preferidos son bacterias, levaduras, algas u hongos.

Las bacterias preferidas son bacterias del género *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* o cianobacterias por ejemplo del género *Synechocystis*. Se prefieren particularmente los microorganismos aquellos que son capaces de infectar las plantas y de esta manera transferir los casetes de la invención. Microorganismos preferidos son aquellas del género *Agrobacterium* y en particular de la especie *Agrobacterium tumefaciens*.

Las levaduras preferidas son *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* o *Pichia*. Los hongos preferidos son *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* u otros hongos descritos en *Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No. 1, 2 (1995)* en la página 15, tabla 6.

Los organismos huéspedes o iniciales preferidos como organismos transgénicos son en particular plantas. Se incluyen para los propósitos de la invención son todos los géneros y especies de plantas superiores e inferiores del reino vegetal. También se incluyen las plantas maduras, semillas, brotes y semilleros, y partes derivadas de estos, material de propagación y cultivos, por ejemplo cultivos celulares. Las plantas maduras significan plantas en cualquier etapa de desarrollo más allá del semillero. El semillero significa una planta joven, inmadura en una etapa de desarrollo precoz.

Las plantas anuales, perennes monocotiledóneas y dicotiledóneas son organismos huéspedes preferidos para producir plantas transgénicas. Las plantas de las siguientes familias de plantas se prefieren: *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Carophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae*, *Tetragoniaceae*, *Theaceae*, *Umbelliferae*.

ES 2 289 529 T3

Las plantas monocotiledóneas preferidas se refieren en particular a las plantas monocotiledóneas de cosecha tales como, por ejemplo, de la familia Gramineae, tal como arroz, maíz, trigo u otras especies de cereales tales como cebada, mijo, centeno, triticale o avena, y azúcar de caña y todas las especies de hierbas.

5 Las plantas dicotiledóneas preferidas se seleccionan en particular de las plantas dicotiledóneas de cosecha tales como, por ejemplo,

- Asteraceae tales como girasol, tagetes o caléndula y muchas otras,

10 - Compositae, especialmente del género *Lactuca*, muy especialmente de las especies sativa (lechuga) y muchas otras,

- Cruciferae, especialmente el género *Brassica*, muy especialmente las especies *napus* (semilla oleaginosa de colza), *campestris* (remolacha), *oleracea cv Tastié* (repollo), *oleracea cv Snowball Y* (coliflor) y *oleracea cv Emperor* (brócoli) y otras especies brassica; y del género *Arabidopsis*, muy especialmente las especies thaliana y muchas otras,

- Cucurbitaceae tales como melón, calabaza o calabacín y muchas otras,

20 - Leguminosae, especialmente el género *Glycine*, muy especialmente las especies *max* (soja), soja y alfalfa, guisante, frijol o maní y muchas otras

- Rubiaceae, preferiblemente de la subclase Lamiidae tales como, por ejemplo, *Coffea arabica* o *Coffea liberica* (arbusto de café) y muchas otras,

25 - Solanaceae, especialmente el género *Lycopersicon*, muy especialmente las especies *esculentum* (tomate) y el género *Solanum*, muy especialmente las especies *tuberosum* (patata) y *melongena* (aubergine), y tabaco o pimentón y muchas otras,

30 - Sterculiaceae, preferiblemente de la subclase Dilleniidae tal como, por ejemplo, *Theobroma cacao* (planta de cacao) y muchas otras,

- Theaceae, preferiblemente de la subclase Dilleniidae tales como, por ejemplo, *Camellia sinensis* o *Thea sinensis* (arbusto del té) y muchas otras,

35 - Umbelliferae, especialmente el género *Daucus* (muy especialmente las especies *carota* (zanahoria) y *Apium* (muy especialmente las especies *graveolens* dulce (apio) y muchas otras; y el género *Capsicum*, muy especialmente las especies *annum* (pimienta) y muchas otras,

40 y lino, soja, algodón, cáñamo (lino), pepino, espinaca, zanahoria, remolacha azucarera y las especies de varios árboles, nuez y vid, especialmente frutas de banana y kiwi.

Se da preferencia a *Nicotiana tabacum*, *Tagetes erecta* y *Calendula officinalis*, y todos los géneros y especies utilizadas como alimentos humanos o animales, tal como las especies de cereales descritos, o son apropiadas para la producción de aceites, tal como las semillas oleaginosas (tal como colza), especies de nueces, soja, girasol, calabaza y maní.

50 Se da más preferencia a todas las plantas de la familia Brassicaceae, muy especialmente las especies *Brassica* tal como *Brassica napus* (semilla oleaginosa de colza), *campestris* (remolacha), *oleracea cv Tastié* (repollo), *oleracea cv Snowball Y* (coliflor) y *oleracea cv Emperor* (brócoli) y otras especies brassica; y del género *Arabidopsis*, muy especialmente la especie thaliana.

55 Los organismos vegetales para los propósitos de la invención son adicionalmente otros organismos aptos en forma fotosintética activos tal como, por ejemplo, algas o bacteria ciano, y musgos. Las algas preferidas son algas verdes tal como, por ejemplo, algas del género *Haematococcus*, *Phaedactylum tricomatum*, *Volvox* o *Dunaliella*. Se da particular preferencia a las algas tales como Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae (diatoms) y Euglenophyceae.

60 La producción de un organismo transformado o de una célula transformada requiere la introducción del ADN apropiado en la célula huésped apropiada. Un gran número de métodos está disponible para este proceso, que se refiere como la transformación (ver también Keown *et al.* (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). Así, por ejemplo, el ADN se puede introducir directamente por microinyección o por bombardeo con micropartículas cubiertas de ADN. La célula también se puede permeabilizar químicamente, por ejemplo con polietilén glicol, así que el ADN puede entrar en la célula por difusión. El ADN también puede tener lugar por fusión de protoplastos con otras unidades que contienen ADN tal como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. La electroporación es otro método apropiado para introducir el ADN, en el cual las células se permeabilizan en forma reversible por un pulso eléctrico.

65 En el caso de plantas, se utilizan los métodos descritos para la transformación y regeneración de las plantas a partir de tejidos vegetales o células vegetales para la transformación transitoria o estable. Los métodos apropiados son en

particular transformación de protoplastos por absorción de polietilen glicol-ADN inducido, el proceso biolístico usando una pistola génica, el así llamado método de bombardeo de partículas, electroporación, incubación de embriones secos en solución que contienen ADN y microinyección.

5 Además de estas técnicas de transformación “directa”, también es posible realizar una transformación por infección bacteriana con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Estas cepas comprenden un plásmido (plásmido Ti o Ri) que se transfiere a la planta después de la infección con *agrobacterium*. Parte de este plásmido, llamado T-ADN (ADN transferido), se integra en el genoma de la célula vegetal.

10 La transformación mediada por *Agrobacterium* es más apropiada para las células vegetales dicotiledóneas, diploides, mientras que las técnicas de transformación directa son apropiadas para cada tipo de célula.

La introducción de un casete de expresión de la invención en las células, preferiblemente en células vegetales, se puede lograr ventajosamente por el uso de vectores.

15 En una modalidad ventajosa, la introducción del casete de expresión se logra por medio de vectores plásmidos. Los vectores preferidos son aquellos que hacen posible la integración estable del casete de expresión en el genoma huésped.

20 En el caso de inyección o electroporación de ADN en las células vegetales, ningún requisito especial se debe encontrar por el plásmido usado. Un plásmido simple tal como aquellos de la serie pUC se puede utilizar. Si las plantas completas se deben regenerar a partir de las células transformadas, es necesario que un gen marcador seleccionable adicional este presente en el plásmido.

25 Las técnicas de transformación se describen para varios organismos vegetales monocotiledóneos y dicotiledóneos. Además, varios posibles vectores de plásmidos están disponibles para introducir genes foráneos en plantas, que ordinariamente comprenden un origen de replicación para la replicación en *E. coli* y un gen marcador para la selección de bacterias transformadas. Ejemplos son pBR322, serie pUC, serie MI 3 mp, pACYC184 etc.

30 El casete de expresión se puede introducir en el vector vía un apropiado sitio de división de restricción. El plásmido resultante primero se introduce en el *E. coli*. El *E. coli* correctamente transformado se selecciona y cultiva, y el plásmido recombinante se aísla por métodos familiares para los trabajadores expertos. El análisis de restricción y secuenciación se puede utilizar para verificar la etapa de clonación.

35 Las células transformadas, i.e. aquellas que contienen el ADN introducido integrado en el ADN de la célula huésped, se pueden seleccionar de las no-transformadas si un marcador seleccionable es un constituyente del ADN introducido. Cualquier gen que es capaz de conferir una resistencia a los antibióticos o herbicidas puede actuar por ejemplo como marcador. Las células transformadas que expresan tal gen marcador son capaces de sobrevivir en la presencia de concentraciones de un apropiado antibiótico o herbicida que mata unas células no-transformadas tipo salvaje. Un ejemplo es el gen *bar* que confiere resistencia a la herbicida fosfotricina (Rathore K S *et al.*, Plant Mol Biol. 1993 March; 21(5):871-884), el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina, el gen *hpt* que confiere resistencia a la higromicina, o el gen *EPSP* que confiere resistencia al herbicida glifosato.

45 Dependiendo del método de introducción del ADN, otros genes pueden ser necesarios en el vector plásmido. Si se utiliza una agrobacteria, el casete de expresión se debe integrar en plásmidos especiales, ya sea en un vector intermedio (o vector lanzadera) como en un vector binario. Si, por ejemplo, un plásmido Ti o Ri se debe utilizar al menos el borde derecho, pero en más casos el borde derecho y el izquierdo del T-ADN del plásmido Ti o Ri se une como la región flanqueante al casete de expresión que se introduce. Se utilizan preferiblemente los vectores binarios. Los vectores binarios pueden replicar en *E. coli* y en *agrobacterium*. Comprenden ordinariamente un gen marcador de selección y un enlace o poliligador flanqueado por la secuencia de T-ADN del borde derecho e izquierdo. Se pueden transformar directamente en *agrobacterium* (Holsters *et al.* (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). El gen marcador de selección permite la selección de *agrobacteria* transformada y es por ejemplo el gen *nptII* que confiere la resistencia a la kanamicina. El *agrobacterium* que actúa como organismo huésped en este caso debería contener ya un plásmido que tiene la región *vir*. Esto es necesario para la transferencia del T-ADN a la célula vegetal. Un *agrobacterium* transformado de esta manera se puede utilizar para transformar las células vegetales.

55 El uso de T-ADN para la transformación de células vegetales se ha investigado intensivamente y se describe (EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley *et al.* (1986) CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 4:1-46 and An *et al.* (1985) EMBO J. 4:277-287). Varios vectores binarios se conocen y algunos son comercialmente disponibles tal como, por ejemplo, pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. U.S.A.).

60 El ADN se transfiere en la célula vegetal por el co-cultivo de los explantes de plantas con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Iniciando a partir del material vegetal infectado (por ejemplo partes de hojas, raíces o tallos, pero también protoplastos o suspensiones de células vegetales), es posible regenerar las plantas completas por el uso de un medio apropiado que puede comprender por ejemplo antibióticos o biocidas para la selección de células transformadas. Las plantas resultantes luego se pueden proteger por la presencia del ADN introducido, en este caso el casete de expresión de la invención. Tan pronto como el ADN se integra en el genoma huésped, el genotipo correspon-

diente es usualmente estable y la correspondiente inserción también se encuentra en las subsiguientes generaciones. El casete de expresión integrado usualmente comprende un marcador de selección (ver arriba). El marcador de selección permite la selección de células transformadas a partir de células no transformadas (McCormick *et al.* (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Las plantas resultantes se pueden cultivar y cruzar de una manera usual. Dos o más generaciones se deben cultivar con el fin de asegurar que la integración genómica es estable y heredable.

Dichos procesos se describen por ejemplo en B. Jené *et al.*, Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by Kung S D & Wu R, Academic Press (1993), pp. 128-143 y in Potrykus I (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42:205-225). La construcción que se expresa es preferiblemente clonada en un vector que es apropiado para transformar el *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo pBin19 (Bevan *et al.* (1984) Nucl Acids Res 12:8711f.).

Tan pronto como una célula transformada vegetal se ha producido, una planta completa se puede obtener utilizando los procesos conocidos por los trabajadores expertos. Esto conlleva a iniciar por ejemplo a partir de los cultivos de callos. La formación del brote y raíz a partir de estos aún en masas celulares sin diferencias se puede inducir de una manera conocida. Los brotes resultantes se pueden plantar fuera y cultivar.

La efectividad de la expresión de los ácidos nucleicos expresados transgénicamente se puede medir por ejemplo *in vitro* por la propagación del meristemo del brote usando uno de los métodos de selección descritos arriba.

También de acuerdo con la invención son las células, cultivos celulares, partes - tal como, por ejemplo, raíces, hojas etc. en el caso de organismos de vegetales transgénicos - y material de propagación transgénica tal como semillas o frutas, derivados de los organismos transgénicos descritos arriba.

Las plantas modificadas genéticamente de la invención que se pueden consumir por humanos y animales también se puede utilizar como alimento humano o alimento animal por ejemplo directamente o después de procesar de una manera conocida *per se*.

Otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de los organismos transgénicos de la invención descritos arriba y de las células, cultivos celulares, partes - tales como, por ejemplo, raíces, hojas etc. en el caso de organismos de vegetales transgénicos - y materiales de propagación transgénica tales como semillas o frutas derivadas de estos para producir alimentos humanos o animales, productos farmacéuticos o químicos finos.

Se da preferencia adicional a un proceso para la producción de productos farmacéuticos o químicos finos recombinantes en organismos huéspedes, donde un organismo huésped se transforma con uno de los casetes o vectores de expresión descritos arriba, y este casete de expresión comprende uno o más genes estructurales que se codifican para el deseado producto químico fino o catalizador de la biosíntesis del deseado producto químico fino, los organismos huésped transformados se cultivan, y el deseado producto químico fino se aísla a partir del medio de cultivo. Este proceso es ampliamente aplicable a los productos químicos finos tales como enzimas, vitaminas, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, saborizantes naturales y sintéticos, sustancias aromatizantes y colorantes. La producción de tocoferoles y tocotrienoles, y de carotenos se prefieren particularmente. El cultivo de los organismos huéspedes transformados, y el aislamiento de los organismos huéspedes o del medio de cultivo tiene lugar por medio de procesos conocidos por los trabajadores expertos. La producción de productos farmacéuticos tales como, por ejemplo, anticuerpos o vacunas se describe en Hood E E, Jilka J M (1999). Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma J K, Vine N D (1999). Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

Secuencias

1. SEQ ID NO: 1 Promotor bidireccional del *Arabidopsis thaliana*. Región intergen entre el gen putativo FD y el gen putativo OASTL hasta en cada caso el supuesto inicio de la transcripción.

2. SEQ ID NO: 2 Promotor bidireccional del *Arabidopsis thaliana* que incluye las regiones 5'-no traducidas del gen putativo FD y del gen putativo OASTL hasta en cada caso el codón inicial ATG. Comparado con la secuencia nativa, la presente secuencia comprende un C adicional en la posición 4 comparado con la secuencia nativa de *Arabidopsis* a través de la introducción de una secuencia de reconocimiento BamHI.

3. SEQ ID NO: 3 Secuencia del plásmido pUH200. El gen GUS se expresa en la dirección del gen FD, y el gen nptII en la dirección del gen OASTL.

4. SEQ ID NO: 4 Secuencia del plásmido pUH201. El gen GUS se expresa en la dirección del gen OASTL, y el gen nptII en la dirección del gen FD.

5. SEQ ID NO: 5 Oligonucleótido cebador pFD3

5'-acggatccgagagacagagacggagacaaaa-3'

6. SEQ ID NO: 6 Oligonucleótido cebador pFD4

5'-gcgatccaagcttcactgcttaaattc-3'

5 Descripción de las figuras

Fig. 1: Representación diagramática de la unidad bidireccional en los vectores UH200 y UH201. RB: borde derecho del *Agrobacterium* T-ADN; CATpA: inhibidor de terminación de la catepsina D; nptII: gen neomicina fosfotransferasa II (gen de resistencia de la kanamicina); FD: región intergen entre FD y gen OASTL (+/-indica la dirección de lectura del gen FD); GUS: gen β -glucuronidasa; 35SpA: terminación del gen 35S CaMV; LB: borde izquierdo del *Agrobacterium* T-ADN.

Fig. 2: Análisis de la actividad GUS en hojas de plantas transgénicas de semilla oleaginosa de colza transformadas con UH 200 (orientación del gen ferredoxina) o UH 201 (orientación del gen OASTL) comparado con las plantas tipo salvaje (WT). Se muestran los resultados de varias líneas de plantas de semilla oleaginosa de colza UH200 o UH201 transformadas (identificadas por el número de la línea respectiva en el eje de la x). La actividad GUS se indica metilumbelliferona pmol (MU)/mg (proteína) min.

Ejemplos

Métodos Generales

Síntesis química de oligonucleótidos, se puede realizar por ejemplo de una manera conocida por el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2nd edition, Wiley Press New York, page 896-897). Las etapas de clonación realizadas para los propósitos de la presente invención, tal como, por ejemplo, división de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación del fragmento de ADNs, transferencia de ácidos nucleicos en membranas de nitrocelulosa y nylon, enlace de fragmento de ADNs, transformación de células de *E. coli*, cultivo de bacteria, replicación de fagos y se realizan análisis de secuencia de ADN recombinante según lo descrito en Sambrook *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6. Moléculas recombinantes de ADN se secuenciaron por el método de Sanger (Sanger *et al.* (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467) usando un secuenciador de ADN con fluorescencia láser suministrado por ABI.

Ejemplo 1

Aislamiento del ADN a partir del *Arabidopsis thaliana*, Tabaco y Semilla oleaginosa de colza

El ADN genómico a partir del *Arabidopsis thaliana*, tabaco y semilla oleaginosa de colza se aisló usando el kit DNeasy plant mini de Qiagen Cat. No. 60106 de acuerdo con el protocolo.

Ejemplo 2

Transformación del Tabaco y la Semilla oleaginosa de colza

La transformación del tabaco se conduce por la infección con *Agrobacterium tumefaciens* de acuerdo con el método desarrollado por Horsch *et al.* (1985) Science 227: 1229-1231). Todas las construcciones utilizadas por la transformación se transformaron por el método congelación/descongelación (repetida descongelación y congelación) en *Agrobacterium tumefaciens*. Las colonias de *Agrobacterium* que contienen la deseada construcción se seleccionaron en medio YEB (extracto carne de bovino al 1% (Difco), 0.5% de enzima caseína hidrolizado, 0.1% de extracto de levadura (Duchefa), 0.5% de sacarosa, MgSO₄ 2 mM, 1.5% de agar), medio con 50 μ g/ml de kanamicina, 40 μ g /ml de gentamicina, 100 μ g /ml de espectinomicina y 25 μ g /ml de rifampicina.

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun N N) se transformaron centrifugando 10 ml de un cultivo durante la noche de *Agrobacterium tumefaciens* cultivado bajo selección, descartando el sobrenadante, y resuspendiendo la bacteria en el mismo volumen de medio libre de antibiótico. Discos de hojas de plantas estériles (diámetro aproximadamente 1 cm) se bañaron en esta solución bacteriana en un caja de Petri estéril. Los discos de hojas luego se colocaron sobre medio MS (Murashige y Skoog (1962) Physiol Plant 15:473ff.) con 2% de sacarosa y 0.8% de agar Bacto en cajas de Petri. Después de la incubación a 25°C en la oscuridad por 2 días, se transfirieron al medio MS con 100 mg/l de kanamicina, 500 mg/l de Claforan, 1 mg/l de bencilaminopurina (BAP), 0.2 mg/l de ácido naftilacético (NAA), 1.6% de glucosa y 0.8% de agar Bacto, y se continuo el cultivo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad). Los brotes cultivados se transfirieron al medio MS libre de hormonas con 2% de sacarosa, 250 mg/l de Claforan y 0.8% de agar Bacto. La semilla oleaginosa de colza se transformó por medio de la transformación del pecíolo por el método de Moloney *et al.* (Moloney M M *et al.* (1989) Plant Cell Rep 8:238-242).

65

ES 2 289 529 T3

Ejemplo 3

Investigación de la Expresión Bidireccional del Promotor FD

5 a) Aislamiento PCR del promotor FD a partir de *Arabidopsis thaliana*

El promotor bidireccional putativo se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* utilizando los cebadores FD3 y FD4. Los nucleótidos en impresión de negrilla para un sitio BamHI se unieron al cebador FD3. Un sitio BamHI se introdujo en el cebador FD4 por inserción de un C (negrilla) como diferencia de la
10 secuencia genómica.

Cebador FD3: (SEQ ID NO: 5)

5'-acggatccgagagacagagacggagacaaaa-3'

15 Cebador FD4: (SEQ ID NO: 6)

5'-gcggatccaagcttcaactgcttaaattc-3'

20 Mezcla de Reacción:

1 μ l de ADN

37 μ l de H₂O

25 5 μ l de 10 veces solución reguladora

1 μ l de cebador FD3 10 μ M

1 μ l de cebador FD4 10 μ M

30 4 μ l de dNTP 2.5 mM

1 μ l de polimerasa de ADN Pfu turbo (Stratagene)

35 Condiciones de PCR:

1 ciclo con 5 min a 95°C

25 ciclos con 52°C por 1 min, 72°C por 1 min y 95°C por 30 seg.

40 1 ciclo con 72°C por 10 min,

Subsiguiente enfriamiento a 4°C hasta el próximo proceso.

45 b) Construcción de los Casetes de Expresión FD:GUS

El producto PCR que comprende el promotor FD se dividió con la enzima de restricción BamHI y se unió en el vector pGUSINT37 (SunGene), así mismo se dividió BamHI. La clonación no dirigida resultó en los dos plásmidos pFD+GUS y pFD-GUS en los cuales el fragmento promotor se coloca delante del gen GUS en orientaciones opuestas en cada caso. El plásmido pFD+GUS contiene el promotor en la dirección de transcripción del gen ferredoxina putativo, y el plásmido pFD-GUS en la orientación del comentado gel O-acetilserina tiol-liasa (OASTL, cisteina sintasa).
50

Ejemplo 4

Producción de Vectores para el Análisis Simultáneo de Ambas Direcciones de Transcripción del Promotor FD

55 Para analizar ambas direcciones de expresión, los genes del marcador de selección NptII y de la glucuronidasa indicadora se colocaron bajo el control del promotor bidireccional en las construcciones. Para este propósito, los plásmidos pFD+GUS y pFD-GUS se dividieron con EcoRI/SalI y clonaron en el vector pS5NptIICat (derivado del vector pSUN; WO 02/00900). Los plásmidos resultantes UH200 (SEQ ID NO: 3) contienen el gen GUS bajo el control de los elementos transcripcionales que actúan en la dirección del gen ferredoxina, y el gen NptII bajo el control de los
60 elementos transcripcionales que actúan en la dirección del gen OASTL. En el plásmido UH201 (SEQ ID NO: 4), el gen GUS está bajo el control de los factores dirigidos OASTL y el gen NptII está bajo el control de los elementos que controlan el gen ferredoxina (ver Fig. 1). Ambas construcciones se transformaron en la cepa agrobacterium GV3101 [pMP90] y se transformaron en tabaco y semilla oleaginosa de colza de acuerdo con los protocolos.
65

ES 2 289 529 T3

Ejemplo 5

Resultados del Análisis de Resistencia a la Kanamicina de las Plantas Transgénicas de Tabaco

5 La regeneración selectiva de la plántula de tabaco se conduce en 100 mg/l de kanamicina. 86% de los explantes de los que fueron transformados con la construcción UH200 desarrollaron plúmulas. 89% de los brotes cortados enraizaron en el medio que contiene kanamicina, y todos fueron transgénicos de acuerdo con los análisis PCR. 70% de los explantes del experimento de transformación con UH201 desarrollaron plúmulas, de las cuales el 90% enraizaron. Una vez más, el análisis PCR reveló que las plántulas contienen la construcción apropiada y son de esta manera transgénicas. Este ejemplo mostró que ambas orientaciones promotor son apropiadas de la misma manera para expresar los marcadores de selección durante la regeneración selectiva del tabaco.

Ejemplo 6

Resultados del Análisis de Resistencia a la Kanamicina de las Plantas Transgénicas de Semilla oleaginosa de colza

15 La regeneración selectiva de los brotes de semilla oleaginosa de colza se conduce en 18 mgA de kanamicina. La eficiencia de la transformación fue 11% para la construcción UH200 y 10% para UH201. Al mismo tiempo, la eficiencia de la transformación bajo el control del promotor de nopalina sintasa se encontró que era el 8%. Este ejemplo mostró que la regeneración selectiva ambos bajo el control del promotor en la dirección OASTL (UH200) y la dirección FD (UH201) es comparable con el nosP normalmente usado.

Ejemplo 7

Análisis GUS de la Especificidad del Tejido del Promotor Bidireccional en las Plantas Transgénicas de Tabaco y Semilla oleaginosa de colza

25 Las dos orientaciones del promotor han mostrado las mismas especificidades del tejido, con la excepción en polen, en las plantas transgénicas de tabaco y de semilla oleaginosa de colza (tabla 1). Mientras que no se encontró ninguna actividad en el polen en la semilla oleaginosa de colza, el polen del tabaco mostró una coloración azul distinta y de esta manera actividad del promotor. La expresión GUS regulada por ambas orientaciones se encontró predominantemente en tejido verde. Ninguna expresión fue detectable en las raíces y pétalos. La actividad GUS fue detectable aún en estados muy inmaduros del desarrollo de la semilla en la semilla oleaginosa de colza.

35 TABLA 1

Visión general de las especificidades del tejido en tabaco y semilla oleaginosa de colza

Tejido		A		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
		siL	soL											
Tabaco	FD	++	++	-	+	+	++	++	+	+	++	-	+	++
	OASTL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	++	-	+	++
Raps	FD	++	++	-	++	nd	+	+	+	+	+	-	+	-

45 ++ alta actividad
 + baja actividad
 - no actividad; nd: no determinada
 A hojas (siL: hojas sumergidas ; soL: hojas de origen)
 B raíces
 C semillas
 D semillero
 E tallo
 F pedúnculo de la flor
 G nodos
 H brote
 I sépalo
 J pétalos
 K anteras
 L polen.

65 La actividad del promotor durante la regeneración selectiva se continuó tiñendo los brotes jóvenes con X-Gluc. Los brotes transgénicos mostraron una tinción azul intenso. Este experimento una vez más mostró la misma actividad del promotor bidireccional en ambas orientaciones.

Ejemplo 8

Análisis GUS Cuantitativo del Promotor Bidireccional en Plantas Transgénicas de Tabaco

5 Para el análisis cuantitativo de la fuerza del promotor FD, se investigaron en paralelo, material de hoja y semilla a partir de plantas transgénicas de ambas construcciones. El ensayo GUS cuantitativo se realizó de acuerdo con el procedimiento de Jefferson con MUG y 4-metilumbelliferona como estándar. Una cantidad similar de la actividad GUS se detectó en las semillas de las plantas de ambas orientaciones. La expresión se midió claramente en material de hoja en ambas direcciones, pero la intensidad fue menos uniforme que en el material de semilla.

10

Ejemplo 9

Análisis GUS Cuantitativo del Promotor Bidireccional en las Plantas Transgénicas de Semilla oleaginosa de colza

15 La semilla oleaginosa de colza se transformó - según lo descrito arriba - así mismo con las construcciones UH200 y UH201. El análisis GUS cuantitativo de material de hoja de plantas transgénicas de semilla oleaginosa de colza mostró que las dos direcciones del promotor mostraron una actividad idéntica. La Fig. 2 muestra los valores para las líneas individuales. El nivel de expresión corresponde a los otros promotores polares de plantas.

20

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aún cuando se ha tomado gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad en este respecto.

25

Documentos de Patentes citados en la descripción

- WO 0264804 A [0003]
- 30 • US 20020108142 A [0003]
- WO 03006660 A [0005] [0005]
- 35 • US 4237224 A [0030]
- US 6110736 A [0043]
- WO 9845456 A [0046] [0046]
- 40 • US 5489520 A [0046]
- US 5510471 A [0046]
- 45 • US 5776760 A [0046]
- US 5864425 A [0046]
- US 5633435 A [0046]
- 50 • US 5627061 A [0046]
- US 5463175 A [0046]
- 55 • EP 0218571 A [0046]
- WO 9927116 A [0046]
- EP 0807836 A [0046]
- 60 • EP 0601092 A [0046]
- WO 0000512 A [0046]
- 65 • WO 9712983 A [0046]
- WO 9811240 A [0046]

ES 2 289 529 T3

- WO 9826045 A [0046]
- WO 9905902 A [0046]
- 5 • WO 9906580 A [0046]
- WO 9904013 A [0046]
- WO 9742326 A [0046]
- 10 • WO 9750561 A [0046]
- US 6169226 B [0054]
- 15 • WO 9932619 A [0058]
- WO 9953050 A [0058]
- WO 0068374 A [0058]
- 20 • WO 0044914 A [0058]
- WO 0044895 A [0058]
- 25 • WO 0049035 A [0058]
- WO 0063364 A [0058]
- EP 0291533 A1 [0059]
- 30 • EP 0321201 A1 [0059]
- EP 0360257 A1 [0059]
- 35 • US 4987071 A [0059]
- US 5116742 A [0059]
- WO 02063039 A [0062]
- 40 • WO 02101006 A [0063]
- WO 03057899 A [0064]
- 45 • WO 9741228 A [0067]
- EP 120516 A [0092]
- WO 0200900 A [0112]
- 50

Literatura no-patentes citada en la descripción

- **ODELL** *et al.* *Nature*, 1985, vol. 313, 810-812 [0002]
- 55 • **KUMPATLA** *et al.* *TIBS*, 1998, vol. 3, 97-104 [0002]
- **SELKER**. *Cell*, 1999, vol. 97, 157-160 [0002]
- 60 • **XIE M.** *Nature Biotech*, 2001, vol. 19, 677-679 [0003]
- **DONG JZ** *et al.* *BIO/TECHNOLOGY*, 1991, vol. 9, 858-863 [0003]
- **SCHENBOM E; GROSCKREUTZ D.** *Mol Biotechnol*, 1999, vol. 13 (1), 29-44 [0017] [0067]
- 65 • **CHUI WL** *et al.* *Curr Biol*, 1996, vol. 6, 325-330 [0017] [0067]
- **LEFFEL SM** *et al.* *Biotechniques*, 1997, vol. 23 (5), 912-8 [0017] [0067]

ES 2 289 529 T3

- **MILLAR** *et al. Plant Mol Biol Rep*, 1992, vol. 10, 324-414 [0017] [0067]
- **JEFFERSON** *et al. EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3901-3907 [0017]
- 5 • **HIGO K** *et al. Nucleic Acids Res*, 1999, vol. 27 (1), 297-300 [0029]
- **KUNKEL** *et al. Methods Enzymol*, 1987, vol. 154, 367-382 [0030]
- **TOMIC** *et al. Nucl Acids Res*, 1990, vol. 12, 1656 [0030]
- 10 • **UPENDER** *et al. Biotechniques*, 1995, vol. 18 (1), 29-30 [0030]
- **MANIATIS T** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0033]
- 15 • **SILHAVY TJ** *et al. Experiments con Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1984 [0033]
- **AUSUBEL FM** *et al. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience*, 1987 [0033]
- 20 • **LAM E; CHUA NH.** *J Biol Chem*, 1991, vol. 266 (26), 17131-17135 [0035]
- **SCHÖFFL F** *et al. Mol Gen Genetics*, 1989, vol. 217 (2-3), 246-53 [0035]
- **ROUSTER J** *et al. Plant J.*, 1998, vol. 15, 435-440 [0037]
- 25 • **LOHMER S** *et al. Plant Cell*, 1993, vol. 5, 65-73 [0037]
- **MCELROY** *et al. Mol Gen Genet*, 1991, vol. 231 (1), 150-160 [0039]
- 30 • **SAUER B.** *Methods*, 1998, vol. 14 (4), 381-92 [0041]
- **EBINUMA H** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 94, 2117-2121 [0046] [0046]
- 35 • **MCCORMICK** *et al. Plant Cell Rep*, 1986, vol. 5, 81-84 [0046] [0093]
- **MCCORMICK** *et al. Plant Cell Reports*, 1986, vol. 5, 81-84 [0046]
- **DE BLOCK** *et al. EMBO J*, 1987, vol. 6, 2513-2518 [0046]
- 40 • **BECKER** *et al. Plant J*, 1994, vol. 5, 299-307 [0046]
- **VICKERS JE** *et al. Plant Mol Biol Rep*, 1996, vol. 14, 363-368 [0046]
- 45 • **THOMPSON CJ** *et al. EMBO J*, 1987, vol. 6, 2519-2523 [0046]
- **STEINRUCKEN HC** *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1980, vol. 94, 1207-1212 [0046]
- **LEVIN JG; SPRINSON DB.** *J Biol Chem*, 1964, vol. 239, 1142-1150 [0046]
- 50 • **COLE DJ.** *Mode of action of glyphosate; A literatura analysis*, 1985, 48-74 [0046]
- New weed control opportunities: development of soy-beans with Roundup Ready™ gen. **PADGETTE SR** *et al. Herbicide Resistant Crops. CRC Press*, 1996, 53-84 [0046]
- 55 • **SAROHA MK; MALIK VS.** *J Plant Biochem Biotechnol*, 1998, vol. 7, 65-72 [0046]
- **PADGETTE SR** *et al. Crop Science*, 1995, vol. 35 (5), 1451-1461 [0046]
- 60 • **PADGETTE SR** *et al. J Nutr.*, 1996, vol. 126 (3), 702-16 [0046]
- **SHAH D** *et al. Science*, 1986, vol. 233, 478-481 [0046]
- **BECK** *et al. Gene*, 1982, vol. 19, 327-336 [0046]
- 65 • **RANDEZ-GIL** *et al. Yeast*, 1995, vol. 11, 1233-1240 [0046]
- **SANZ** *et al. Yeast*, 1994, vol. 10, 1195-1202 [0046]

ES 2 289 529 T3

- SATHASIVAN K *et al. Nucleic Acids Res.*, 1990, vol. 18 (8), 2188 [0046]
- DATTA N; RICHMOND MH. *Biochem J.*, 1966, vol. 98 (1), 204-9 [0046]
- 5 • HEFFRON F *et al. J. Bacteriol.*, 1975, vol. 122, 250-256 [0046]
- BOLIVAR F *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95-114 [0046]
- KOPREK T *et al. Plant J*, 1999, vol. 19 (6), 719-726 [0046]
- 10 • GLEAVE AP *et al. Plant Mol Biol.*, 1999, vol. 40 (2), 223-35 [0046]
- PERERA RJ *et al. Plant Mol. Biol.*, 1993, vol. 23 (4), 793-799 [0046]
- 15 • STOUGAARD J. *Plant J*, 1993, vol. 3, 755-761 [0046]
- KOPREK *et al. Plant J*, 1999, vol. 16, 719-726 [0046]
- NAESTED H. *Plant J*, 1999, vol. 18, 571-576 [0046]
- 20 • SUNDARESAN V *et al. Genes & Development*, 1995, vol. 9, 1797-1810 [0046]
- FEDOROFF NV; SMITH DL. *Plant J*, 1993, vol. 3, 273-289 [0046]
- 25 • PEI ZM *et al. Science*, 1998, vol. 282, 287-290 [0046]
- DEAK M *et al. Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 192-196 [0046]
- DUNWELL JM. *Biotechnology y Genetic Engeneering Reviews*, 1998, vol. 15, 1-32 [0046]
- 30 • KASUGA M *et al. Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 276-286 [0046]
- RASK L *et al. Plant Mol Biol*, 2000, vol. 42, 93-113 [0046]
- 35 • MENARD R *et al. Phytochemistry*, 1999, vol. 52, 29-35 [0046]
- VAECK *et al. Nature*, 1987, vol. 328, 33-37 [0046]
- BROGLIE *et al. Science*, 1991, vol. 254, 1194-119 [0046]
- 40 • CHENG X *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95 (6), 2767-2772 [0046]
- NAYAK P *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94 (6), 2111-2116 [0046]
- 45 • GIRKE *et al. Plant J*, 1998, vol. 15, 39-48 [0046]
- SAKURADANI *et al. Gene*, 1999, vol. 238, 445-453 [0046]
- MICHAELSON *et al. FEBS Letters*, 1998, vol. 439, 215-218 [0046]
- 50 • MICHAELSON *et al. J Biol Chem*, vol. 273, 19055-19059 [0046]
- BEAUDOIN *et al. Proc Natl. Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 6421-6426 [0046]
- 55 • ZANK *et al. Biochemical Society Transactions*, 2000, vol. 28, 654-657 [0046]
- HOOD EE; JILKA JM. *Curr Opin Biotechnol.*, 1999, vol. 10 (4), 382-6 [0046]
- MA JK; VINE ND. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, vol. 236, 275-92 [0046] [0100]
- 60 • HOOD *et al. Adv Exp Med Biol*, 1999, vol. 464, 127-47 [0046]
- DUNWELL JM. *J Exp Bot.*, 2000, vol. 51 (487-96 [0047]
- 65 • GALLIE *et al. Nucl Acids Res*, 1987, vol. 15, 8693-8711 [0049] [0050]
- KLOSGEN RB; WEIL JH. *Mol Gen Genet*, 1991, vol. 225 (2), 297-304 [0049]

ES 2 289 529 T3

- VAN BREUSEGEM F *et al. Plant Mol Biol*, 1998, vol. 38 (3), 491-496 [0049]
- BEERLI RR *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97 (4), 1495-500 [0051]
- 5 • TADA Y *et al. FEBS Lett*, 1996, vol. 391 (3), 341-345 [0054]
- NAKAMURA R. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, vol. 60 (8), 1215-1221 [0054]
- FORKMANN G; MARTENS S. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, vol. 12 (2), 155-160 [0054]
- 10 • SCHWALL GP *et al. Nat Biotechnol*, 2000, vol. 18 (5), 551-554 [0054]
- GAULTIER *et al. Nucleic Acids Res*, 1987, vol. 15, 6625-6641 [0056]
- 15 • GORING *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 1770-1774 [0057]
- SMITH *et al. Mol Gen Genet*, 1990, vol. 224, 447-481 [0057]
- NAPOLI *et al. Plant Cell*, 1990, vol. 2, 279-289 [0057]
- 20 • VAN DER KROL *et al. Plant Cell*, 1990, vol. 2, 291-299 [0057]
- MATZKE MA *et al. Plant Mol Biol*, 2000, vol. 43, 401-415 [0058]
- 25 • FIRE A. *et al. Nature*, 1998, vol. 391, 806-811 [0058]
- TANNER NK. *FEMS Microbiol Rev.*, 1999, vol. 23 (3), 257-75 [0059]
- RIBOZYMES *et al. Methods in Cell Biology* 50. Academic Press, Inc, 1995, 449-460 [0059]
- 30 • BAYLEY CC *et al. Plant Mol Biol.*, 1992, vol. 18 (2), 353-361 [0059]
- DAVIS RW *et al. Mol Gen Genet.*, Marz 1994, vol. 242 (6), 653-657 [0059]
- 35 • HASELHOFF; GERLACH. *Nature*, 1988, vol. 334, 585-591 [0059]
- BARTEL D; SZOSTAK JW. *Science*, 1993, vol. 261, 1411-1418 [0059]
- HELENE C. *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569-84 [0060]
- 40 • HELENE C *et al. Ann NY Acad Sci*, 1992, vol. 660 (12), 27-36 [0060]
- MÄHER LJ. *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807-815 [0060]
- 45 • SHEEN *et al. Plant Journal*, 1995, vol. 8 (5), 777-784 [0067]
- HASELOFF *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94 (6), 2122-2127 [0067]
- REICHEL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93 (12), 5888-5893 [0067]
- 50 • TIAN *et al. Plant Cell Rep*, 1997, vol. 16, 267-271 [0067]
- FROMM *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, vol. 82, 5824-5828 [0067]
- 55 • OW *et al. Science*, 1986, vol. 234, 856-859 [0067]
- JEFFERSON *et al. EMBO J*, 1987, vol. 6, 3901-3907 [0067]
- DELLAPORTA *et al. Chromosome Structure y Function: Impact de New Concepts. 18th Stadler Genetics*
60 *Symposium*, 1988, vol. 11, 263-282 [0067]
- SUTCLIFFE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, vol. 75, 3737-3741 [0067]
- ZUKOWSKY *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, vol. 80, 1101-1105 [0067]
- 65 • IKUTA *et al. Bio/Technol*, 1990, vol. 8, 241-242 [0067]

ES 2 289 529 T3

- **KATZ** *et al.* *J Gen Microbiol*, 1983, vol. 129, 2703-2714 [0067]
- **PRASHER** *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, vol. 126 (3), 1259-1268 [0067]
- 5 • **SAMBROOK** *et al.* *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0067]
- **KEOWN** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0081]
- 10 • **RATHORE KS** *et al.* *Plant Mol Biol.*, Marz 1993, vol. 21 (5), 871-884 [0090]
- **HOLSTERS** *et al.* *Mol. Gen. Genet.*, 1978, vol. 163, 181-187 [0091]
- **FRALEY** *et al.* *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.*, 1986, vol. 4, 1-46 [0092]
- 15 • **AN** *et al.* *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 277-287 [0092]
- Techniques for Gene Transfer, in: *Transgenic Plants. B. JENES et al. Engineering y Utilization*. Academic Press, 1993, vol. 1, 128-143 [0094]
- 20 • **POTRYKUS I.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, vol. 42, 205-225 [0094]
- **BEVAN** *et al.* *Nucl Acids Res*, 1984, vol. 12, 8711f [0094]
- 25 • **HOOD EE; JILKA JM.** *Curr Opin Biotechnol*, 1999, vol. 10 (4), 382-6 [0100]
- **VOET.** Voet. Wiley Press, 896-897 [0103]
- **SAMBROOK et al.** *Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter ADN*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0103]
- 30 • **SANGER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0103]
- **HORSCH** *et al.* *Science*, 1985, vol. 227, 1229-1231 [0105]
- 35 • **MOLONEY MM** *et al.* *Plant Cell Rep*, 1989, vol. 8, 238-242 [0107]

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un casete de expresión transgénica para la expresión de dos secuencias de ácidos nucleicos en una célula vegetal que comprende al menos una secuencia reguladora seleccionada del grupo que consiste de

a) el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,

10 b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,

15 c) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, y

20 d) fragmentos equivalentes funcionalmente de las secuencias a) o b) o c), que tienen al menos 25 nucleótidos consecutivos de dichas secuencias a) o b) o c) y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, donde dicha secuencia reguladora se sitúa entre dos secuencias de ácidos nucleicos y es heteróloga en relación con dichas secuencias de ácidos nucleicos y es funcionalmente asociada a dichas secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que la expresión de dos diferentes secuencias de ácido ribonucleico se produce en al menos una célula vegetal, donde dichas secuencias de ácido ribonucleico se seleccionan a partir de las secuencias de ácido ribonucleico codificadas por:

25 i) secuencias de aminoácidos o

ii) secuencias de ácido ribonucleico que producen una reducción en la expresión de al menos un gen endógeno de dicha célula vegetal.

30 2. El casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, donde las dos secuencias de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente son diferentes y codifican por una de las siguientes combinaciones

i) marcador de selección y proteína indicadora

35 ii) proteína diana y marcador de selección o proteína indicadora

ii) dos proteínas diana de la misma ruta metabólica

iii) ARN sentido y antisentido

40 iv) varias proteínas de defensa contra los patógenos.

45 3. El casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente se selecciona de ácidos nucleicos codificados por marcadores de selección, genes indicadores, celulasas, quitinasas, glucanasas, proteínas que inactivan los ribosomas, lisozimas, endotoxinas *Bacillus thuringiensis*, inhibidores de α -amilasa, inhibidores de proteasa, lecitinas, ARNasas, ribozimas, acetil-CoA carboxilasas, fitasas, 2S albúmina de *Bertholletia excelsa*, proteínas anticongelantes, trehalosa-fosfato sintasas, trehalosa-fosfato fosfatasa, trehalasas, factor DREB1A, farnesil transferasas, ferritina, oxalato oxidasas, proteína quinasa dependientes del calcio, calcineurinas, glutamato dehidrogenasas, citocromo P-450 multifuncional N-hidroxilación, activador transcripcional CBF1, fitoeno desaturasas, poligalacturonasas, flavonoidas 3'-hidroxilasas, dihidroflavanol 4-reductasas, chalcona isomerasas, chalcona sintasas, flavonona 3-beta-hidroxilasas, flavona sintasa II, enzima Q de ramificación, enzimas de ramificación de almidón.

55 4. El casete de expresión transgénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente se selecciona del grupo que consiste de marcadores de selección positivos, marcadores de selección negativos y factores que proporcionan una ventaja en el crecimiento.

60 5. El casete de expresión transgénica de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, donde el marcador de selección se escoge del grupo que consiste de proteínas que confieren una resistencia a los antibióticos, inhibidores del metabolismo, herbicidas o biocidas.

65 6. El casete de expresión transgénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, donde el marcador de selección se escoge del grupo que consiste de proteínas que confieren una resistencia a la fosfotricina, glifosato, bromoxinilo, dalapon, 2-deoxiglucosa 6-fosfato, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, G 418, neomicina, paromomicina, bleomicina, zeocina, higromicina, cloramfenicol, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de imidazolona.

ES 2 289 529 T3

7. El casete de expresión transgénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4 a 6, donde el marcador de selección se selecciona del grupo que consiste de fosfotricina acetiltransferasas, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasas, glifosato oxidoreductasas, dehalogenasa, nitrilasas, neomicina fosfotransferasas, genes DOG^R1, acetolactato sintasas, higromicina fosfotransferasas, cloramfenicol acetiltransferasas, estreptomina adenililtransferasas, β -lactamasas, genes tetA, genes tetR, isopenteniltransferasas, timidina quinasas, toxina A de la difteria, citosina deaminasa (codA), citocromo P450, haloalcano dehalogenasas, genes iaaH, genes tms2, β -glucuronidasas, manosa- 6-fosfato isomerasas, UDP-galactosa 4-epimerasas.
8. Un vector de expresión transgénica que comprende un casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un organismo vegetal transgénico transformado con un casete de expresión transgénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o con un vector de expresión transgénica de acuerdo con la reivindicación 8.
10. El organismo vegetal transgénico de acuerdo con la reivindicación 9, seleccionado del grupo que consiste de arabisopsis, tomate, tabaco, patatas, maíz, semilla oleaginosa de colza, trigo, cebada, girasoles, mijo, remolacha, centeno, avena, remolacha azucarera, frijol y soja.
11. Una célula, cultivo celular, parte o material de propagación transgénica derivados de un organismo vegetal transgénico de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.
12. Un proceso para la expresión transgénica de dos secuencias de ácido ribonucleico en células vegetales, donde un casete de expresión que comprende al menos una secuencia reguladora seleccionada de un grupo que consiste de
- a) el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
 - b) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene una identidad de al menos 80% a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2,
 - c) equivalentes funcionales del promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2 que comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 o 2 y que tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, y
 - d) fragmentos equivalentes funcionalmente de las secuencias a) o b) o c), que tienen al menos 25 nucleótidos consecutivos de dichas secuencias a) o b) o c) y tienen sustancialmente la misma actividad del promotor que el promotor mostrado en la SEQ ID NO: 1 o 2, se introducen en al menos una célula vegetal, donde dicha secuencia reguladora se sitúa entre dos secuencias de ácidos nucleicos y es heteróloga en relación con dicha secuencia de ácidos nucleicos y se une funcionalmente a dichas secuencias de ácidos nucleicos de tal manera que la expresión de las citadas dos diferentes secuencias de ácido ribonucleico se produce en al menos dicha célula vegetal, donde dichas secuencias de ácido ribonucleico se seleccionan de las secuencias de ácido ribonucleico codificadas por
 - i) secuencias de aminoácidos o
 - ii) secuencias de ácido ribonucleico que producen una reducción en la expresión de al menos un gen endógeno de dicha célula vegetal.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, donde las dos secuencias de ácidos nucleicos que se expresan transgénicamente son diferentes y codifican por una de las siguientes combinaciones
- i) marcador de selección y proteína indicadora
 - ii) proteína diana y marcador de selección o proteína indicadora
 - iii) dos proteínas diana de la misma ruta metabólica
 - iv) ARN sentido y antisentido
 - v) varias proteínas de defensa contra patógenos.
14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, donde al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos que se expresa transgénicamente se selecciona de los ácidos nucleicos según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.
15. El uso de un organismo vegetal transgénico de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 o de cultivos celulares, partes o material de propagación transgénica derivados de estos de acuerdo con la reivindicación 11 para producir alimentos humanos o animales, semillas, productos farmacéuticos o químicos finos.

ES 2 289 529 T3

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde los productos químicos finos son anticuerpos, enzimas, proteínas activas farmacéuticamente, vitaminas, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos saturados o insaturados, saborizantes, sustancias aromatizantes o colorantes naturales o sintéticos.

- 5 17. Un proceso para producir productos farmacéuticos o químicos finos en organismos de vegetales transgénicos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 o cultivos celulares, partes o material de propagación transgénica derivados de estos de acuerdo con la reivindicación 11, que comprenden el cultivo del organismo vegetal transgénico y el aislamiento del deseado producto farmacéutico o del deseado producto químico fino.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

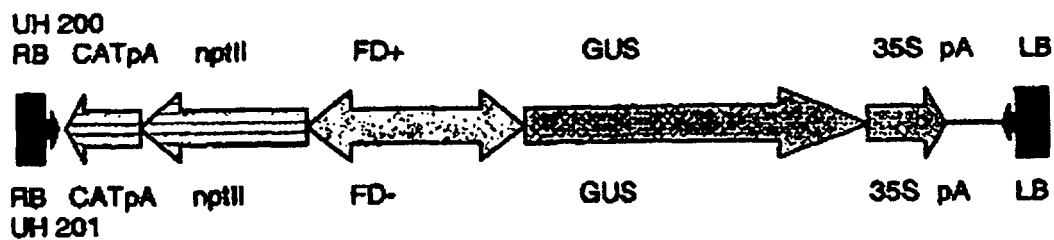


Fig. 1

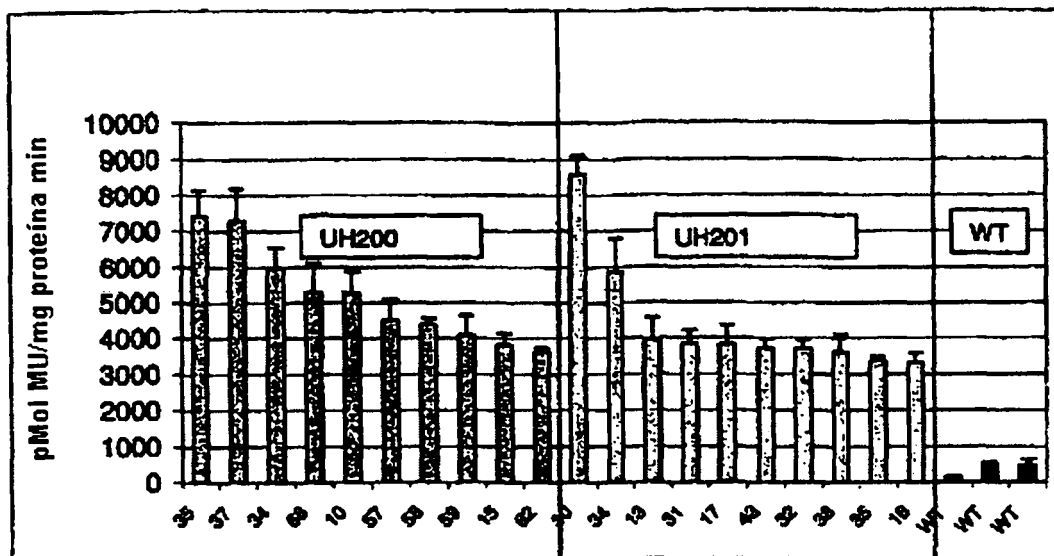


Fig. 2

ES 2 289 529 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> SunGene GmbH&Co.KGaA
<120> Casetes de expresión para la expresión transgénica bi-direccional de los ácidos nucleicos en vegetales
5 <130> AE 20030535
<160> 6
<170> Patente versión 3.1
10 <210> 1
<211> 429
<212> ADN
<213> *Arabidopsis thaliana*
15 <220>
<221> promotor
<222> (1)..(429)
20 <223>

<400> 1

25 **gtatggaata aaatcttcga atgatgagat atatgatctc ttgggtgtca gtcacatggc 60**
acacgctatc aatttagaaa aacgcgggtgg ttggtcacca gaattactac ttctcgggtct 120
gatttgggtca tatccgtatt aagtcgggtt aatattttcc ataactgggg tttgaacatt 180
cggtttcttt ttttcagtta gtccgatttg gagttttgag tatggaaaaa taatactgaa 240
30 **tttattttgtt caaactgttt tggaaaaaat atttccctta attacgaata taattaaaat 300**
tttaaaattc attttattag atctttggta attcggttta atgcattaat gaatttcgggt 360
ttaagtcgggt ttctcggtttt tatgtcccac cactatctac aaccgatgat caaccottatc 420
tccgtattc 429
35
<210> 2
<211> 836
<212> ADN
40 <213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> promotor
<222> (344)..(772)
45 <223>
<220>
<221> Intron
50 <222> (14)..(281)
<223> 1st intrón del gen OASTL
<220>
<221> 5' UTR
55 <222> (773)..(836)
<223> 5' UTR del gen FD
<220>
60 <221> 5' UTR
<222> (1)..(343)
<223> 5' -UTR del gen OASTL que comprende intrón
65

ES 2 289 529 T3

<400> 2

5	gatccaagct	tcaactgctta	aattcacaaa	aagagaaaag	taagaccaa	ggaataaatc	60
	atocctcaaac	caaaaacaca	tcatacaaaa	tcatacaaca	taaactctcca	gatgtatgag	120
	caccaatcca	gttatacaac	actcttaaca	ccaaatcaac	agatttaaca	gCGAATAAG	180
	cttaagccca	tacaattatc	cgatccaaac	aaatataatc	gaaaccggca	gaggaataag	240
	caagtgaatc	aaaaagtatg	ggacgaggaa	gaagatgata	cctgaatgag	aaagtcaata	300
10	accttgaccc	gaatcgtttt	gaagaaaatg	gagaaaatcg	gttgtatgga	ataaaatctt	360
	cgaatgatga	gatatatgat	ctctttgggtg	tcagtcacat	ggcacacgct	atcaatttag	420
	aaaaacgcgg	tggttgggtca	ccagaattac	tacttctcgg	tctgatttgg	tcatatccgt	480
15	attaagtccg	gttaatatctt	tccataactg	gggtttgaac	attcggtttc	ttttttcag	540
	ttagtccgat	ttggagtctt	gagtatggaa	aaataatact	gaatttattt	gttcaaactg	600
	ttttggaaaa	aatatttccc	ttaattacga	atataattaa	aattttaaaa	ttcattttat	660
	tagatcttgg	ttaattcgggt	ttaatgcatt	aatgaatttc	ggtttaagtc	ggtttccggt	720
20	ttttatgtcc	caccactatc	tacaaccgat	gatcaacctt	atctccgtat	tcaccacaaa	780
	cagtcacac	tctcacttga	cacaaaaact	cttttgtctc	cgctctctctg	tctctc	836

25 <210> 3

<211> 11533

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Vector de expresión UH200

35 <400> 3

	ttccatggac	atacaaatgg	acgaacggat	aaaccttttc	acgccctttt	aaatatccga	60
	ttattctaat	aaacgctctt	ttctottagg	tttaccgcc	aatatatcct	gtcaaacact	120
40	gatagttaa	actgaaggcg	ggaaacgaca	atcagatcta	gtaggaaca	gctatgacca	180
	tgattacgcc	aagcttgcac	gccgatcccc	cccactccgc	cctacactcg	tatatatatg	240
	cctaaacctg	ccccgttcc	catatgtgat	attattattt	cattattagg	tataagatag	300
	taaacgataa	gaaagacaa	tttattgaga	aagccatgct	aaaatataga	tagatatacc	360
45	ttagcaggty	tttattttac	aacataacat	aacatagtag	ctagccagca	ggcaggctaa	420
	aacatagtat	agtctatctg	caggggggtac	ggtcgaactc	agactagtgg	atccgtcgaa	480
	gctagcttgg	gtcccgtca	gaagaactcg	tcaagaaggc	gatagaaggc	gatgcgctgc	540
50	gaatcgggag	cggcgatacc	gtaaagcacg	aggaagcgggt	cagcccatte	gccgccaagc	600
	tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgct	atgtctctgat	agcgggtccgc	cacaccagc	660

55

60

65

ES 2 289 529 T3

5 cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag 720
 gcatcgccat gggtcacgac gagatccteg cegtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg 780
 aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga 840
 cggccttcca tccgagtacg tgctcgtctg atgcatgtt tgccttgggt gtcgaatggg 900
 caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc 960
 tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tccctgcccc gcacttcgcc caatagcagc 1020
 10 cagtccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagetg cgcaaggaaac gcccgctcgtg 1080
 gccagccacg atagcccgcg tcctcgtctc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg 1140
 gtcttgacaa aaagaaccgg gcgcccctgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag 1200
 cagccgattg tctgtttgtg ccagtcatag cogaatagcc tctccacca agcggccgga 1260
 15 gaacctgctg gcaatccatc ttgttcaatc caagctccca tgggcccctcg actagagtcg 1320
 agatccgata tcgccccggc tcgactctag aggatccaag cttcactgct taaattcaca 1380
 aaaagagaaa agtaagacca aaggaataaa tcctcctcaa accaaaaaca catcatacaa 1440
 aatcatcaaa cataaatctc cagatgtatg agcaccaatc cagttataca acactcttaa 1500
 20 caccaaatca acagatttaa cagcgaaata agcttaagcc catacaatta tccgatccaa 1560
 acaaatataa tcgaaaccgg cagaggaata agcaagtga tcaaaaagta tgggacgagg 1620
 aagaagatga tacctgaatg agaaagtcaa taaccttgac ccgaatcgtt ttgaagaaaa 1680
 tggagaaaat cggttgtatg gaataaaatc ttcgaatgat gagatatatg atctctttgg 1740
 25 tgtcagtcac atggcacacg ctatcaattt agaaaaacgc ggtggttggg caccagaatt 1800
 actacttctc ggtctgattt ggtcatatcc gtattaagtc cggttaatat tttccataac 1860
 tggggtttga acattcgggt tctttttttc agttagtcg atttggagtt ttgagtatgg 1920
 aaaataata ctgaatttat ttgttcaaac tgttttggaa aaaatatttc ctttaattac 1980
 30 gaatataatt aaaattttaa aattcatttt attagatctt ggttaattcg gtttaatgca 2040
 ttaatgaatt tcggtttaag tcggttttcg gtttttatgt cccaccacta tetacaaccg 2100
 atgatcaacc ttatctccgt attcaccaca aacagtcatc actctcactt gacacaaaaa 2160
 ctcttttctc tccgtctctc tgtctctcgg atccccgggt aggtcagtc cttatgttac 2220
 35 gtcctgtaga aaccccaacc cgtgaaatca aaaaactcga cggcctgtgg gcattcagtc 2280
 tggatcgca aaactgtgga attggtcagc gttgggtgga aagcgcggtt caagaaagcc 2340
 gggcaattgc tgtgccagga gtttttaacg atcaagttcg ccgatgccag atattcgtaa 2400
 ttatgccggc aacgtcttgg tatcagcgcc gaagtcttta tcccgaaagg ttgggcaggc 2460
 40 cagcgtatcg tgctcgttt cgatcgcgtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat 2520
 caggaaagtga tggagcatca gggcggtat acgccattg aagccgatgt cacgccgat 2580
 gttattgccg ggaaaagtgt acgtaagttt ctgcttctac ctttgatata tatataataa 2640
 ttatcattaa ttagtagtaa tataatattt caaatattt tttcaataa aaagaatgta 2700
 45 gtatatagca attgcttttc ttagtattat aagtgtgat attttaattt ataacttttc 2760
 taatatatga ccaaaatttg ttgatgtgca ggtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg 2820
 aactggcaga ctatccccgc gggaaatggg attaccgacg aaaacggcaa gaaaaagcag 2880
 tcttacttcc atgatttctt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat gctctacacc 2940
 50 acgccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtggtgacgc atgtcgcgca agactgtaac 3000
 cacgcgtctg ttgactggca ggtggtggcc aatggtgatg tcagcgttga actgcgtgat 3060
 gcggatcaac aggtggttgc aactggacaa ggactagcgg ggactttgca agtgggtgat 3120
 cgcacctct ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac tgtgcgtcac agccaaaagc 3180
 55 cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc ggtcagtgcc agtgaagggc 3240
 gaacagttcc tgattaacca caaacgctc tactttactg gctttggtcg tcatgaagat 3300
 gcggacttac gtggcaagg attcgataac gtgctgatgg tgcacgacca cgcattaatg 3360

ES 2 289 529 T3

5 gactggattg gggccaactc ctaccgtacc tgcattacc cttacgctga agagatgctc 3420
 gactgggcag atgaacatgg catcggtggg attgatgaaa ctgctgctgt cggetttaac 3480
 ctctctttag gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgta cagcgaagag 3540
 gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga ttaaagagct gatagcgcgt 3600
 gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcc aagaaccgga taccgctccg 3660
 caagtgcacg ggaatatttc gccactggcg gaagcaacgc gtaaactcga cccgacgcgt 3720
 cccgatcacct gcgtcaatgt aatgttctgc gacgctcaca ccgataccat cagcgatctc 3780
 10 tttgatgtgc tgtgcctgaa ccgttattac ggatggatg tccaaagcgg cgatttggaa 3840
 acggcagaga aggtactgga aaaagaactt ctggcctggc aggagaaact gcacagccg 3900
 attatcatca ccgaatacgg cgtggatagc ttagccgggc tgcaactcaat gtacaccgac 3960
 15 atgtggagtg aagagtatca gtgtgcatgg ctggatattg atcaccgcgt ctttgatcgc 4020
 gtcagcgcgg tcgtcgggtg acaggtatgg aatttcgccc attttgccgac ctccgaaggc 4080
 atattgcgcg ttggcggtaa caagaaaggg atcttcactc gccaccgcaa accgaagtcg 4140
 gcgcttttc tgctgcaaaa acgctggact ggcataactc tcggtgaaaa accgcagcag 4200
 20 ggaggcaaac aatgaatcaa caactctcct ggcgcacat cgtcggctac agcctcggga 4260
 attgctaccg agctcggtag ccggcgcaaa aatcaccagt ctctctctac aaatctatct 4320
 ctctctatct ttctccagaa taatgtgtga gtagttccca gataagggaa ttagggttct 4380
 tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaccct tagtatgat ttgtatttgt 4440
 25 aaaaacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca aaatccagtg accgggtacc 4500
 gagctcgaat tcaactggccg tcgttttaca acgactcagc agcttgacag gaggcccgat 4560
 ctagtaacat agatgacacc gcgcgcgata atttatecta gtttgccgac tatattttgt 4620
 tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaacc catctcataa 4680
 30 ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata 4740
 tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt 4800
 ttgaacgatc ggggatcctc cgggtctgtg gcgggaactc cacgaaaata tccgaacgca 4860
 gcaagatcgg tcgatcgaact cagatctggg taactggcct aactggcctt ggaggagctg 4920
 35 gcaactcaaa atccctttgc caaaaaccaa catcatgcc a tccaccatgc ttgtatccag 4980
 ccgcgcgcaa tgtaccccgc gctgtgtate ccaaagcctc atgcaacct a acagatggat 5040
 cgtttggag gcctataaca gcaaccacag acttaaaacc ttgcgcctcc atagacttaa 5100
 40 gcaaatgtgt gtacaatgta gatcctaggc ccaacctttg atgcctatgt gacacgtaaa 5160
 cagtactctc aactgtccaa tcgtaagcgt tccctagcct ccagggccca gcgtaagcaa 5220
 taccagccac aacaccctca acctcagcaa ccaaccaagg gtatctatct tgcaacctct 5280
 ctaggtcacc aatccactct tgtgggtgtt gtggctctgt cctaaagtte actgtagacg 5340
 45 tctcaatgta atggttaacg atgtcaciaa ccgcggccat atcggtctgt gtagctggcc 5400
 taatctcaac tggctctctc tccggagaca tgtcgagatt atttggattg agagtgaata 5460
 tgagactcta attggatacc gaggggaatt tatggaacgt cagtggagca tttttgacaa 5520
 gaaatatttg ctagctgata gtgaccttag gcgacttttg aacgcgcaat aatggtttct 5580
 50 gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaaccgggg ctgagtggt ccttcaacgt 5640
 tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc gggggtcata 5700
 acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg tttcccgcct tcagtttaaa 5760
 ctatcagtgt ttgacaggat cctgcttggg aataattgtc attagattgt ttttatgcat 5820
 55 agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaa cggatgtaa ttcagtacat 5880
 taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata 5940
 tatcctgcc aacagcagcc aacagctccc cgaccggcag ctggcaciaa aatcaccagc 6000
 60 cgttaccacc acgcggccg gccgcattgg gttgaccgtg ttcgcccgca ttgccgagtt 6060

65

ES 2 289 529 T3

cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcggggcgc gagggccgcca agggcccggagg 6120
 cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag atcgcgcacg cccgcgagct 6180
 gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca ctgcttggcg tgcacgctc 6240
 5 gacctgtac cgcgcacttg agcgcagcga ggaagtgaag cccaccggagg ccaggcggcg 6300
 cggtgccctc cgtgaggacg cattgaccga ggcgcagcgc ctggcggccg ccgagaatga 6360
 acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttcatt 6420
 10 accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg tgttcgagcc gcccgcgcac 6480
 gtctcaaccg tgcggctgca tgaatcctg gccggtttgt ctgatgccaa gctggcggcc 6540
 tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgcgcgc gtctaaaaag gtgatgtgta 6600
 tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata tgatgcatg agtaataaa 6660
 15 caaatacgca aggggaacgc atgaaggta tcgctgtact taaccagaaa ggcgggtcag 6720
 gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgcctgca actcgccggg gccgatgttc 6780
 tgttagtcca tccgatccc cagggcagtg cccgcgattg ggcggccgtg cgggaagatc 6840
 aaccgctaac cgttctcgcc atcgaccgcc cgacgattga ccgcgacgtg aaggccatcg 6900
 20 gccggcgcga cttcgtagtg atcgacggag cgcgccaggc ggcggacttg gctgtgtccg 6960
 cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cgggtgcagc aagcccttac gacatatggg 7020
 ccaccgccga cctggtggag ctggttaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac 7080
 aagcggcctt tgtctgtcg cgggcgatca aaggcacgcg catcggcggg gagggtgctg 7140
 25 aggcgctggc cgggtacgag ctgccattc ttgagtcccg tatcacgcag cgcgtgagct 7200
 acccaggcac tgcgcccgcc ggcacaaccg ttcttgaatc agaaccggag ggcgacgctg 7260
 cccgcgaggt ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaa actcatttga gttaatgagg 7320
 taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc ggccgtccga gcgcacgcag 7380
 30 cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca gccatgaagc gggtaactt 7440
 tcagttgccg gcggaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgcc aaggcaagac 7500
 cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca gagtaaatga gcaaatgaat 7560
 aaatgagtag atgaaattta ggcgctaagg gaggcggcat ggaaatcaa gaacaaccag 7620
 35 gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg cggttggcca ggcgtaagcg 7680
 gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc caagcccggag gaatcggcgt 7740
 gagcggctgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggt 7800
 ggagaagttg aaggccgcgc aggcgcgcca gcggcaacgc atcgaggcag aagcacgccc 7860
 40 cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaa gaatcccggc aaccgcggc 7920
 agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac gagcaaccag attttttcgt 7980
 tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc atcatggagc tggccgtttt 8040
 ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg 8100
 45 gcacgtagag gtttccgcag ggcgggcccg catggccagt gtgtgggatt acgacctggt 8160
 actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga 8220
 caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc 8280
 cgatggcggg aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc attcggttaa acaccacgca 8340
 50 cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc ctggtgacgg tatccgaggg 8400
 tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa accgggcggc cggagtacat 8460
 cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cyagatcaca gaaggcaaga acccggacgt 8520
 55 gctgacgggt cacccegat actttttgat cgatcccggc atcggccggt ttctctaccg 8580
 cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga 8640
 acgcagtggc agcgcgggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgca agctgatcgg 8700
 60 gtcaaatgac ctgccggagt acgatttga gggaggggcg gggcaggtcg gcccgatcct 8760

ES 2 289 529 T3

agtcatgCGC taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga 8820
 gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaanaaggc cgaaaaggtc tttttcctgt 8880
 5 ggatagcacg tacattggga acccaaaaggc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg 8940
 gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa 9000
 aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaaccgcct 9060
 10 ggctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgcctaccct 9120
 tcggtegtg cgetccctac gccccgcgc ttcgctcgg cctatcgcgg cegctggccg 9180
 ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg cgcggacaag ccgcgccgtc 9240
 gccactcgac cgcggcgcc cacatcaagg caccctgcct cgcgcgttcc ggtgatgacg 9300
 gtgaaaacct ctgacacatg cagctccggg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg 9360
 15 cggggagcag acaagcccgt cagggcgct cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgag 9420
 ccatgacca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg cggcatcaga 9480
 gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag 9540
 aaaataccgc atcaggcgt cttccgcttc ctgctcact gactcgtgc gctcgtcgt 9600
 20 tcgctcggg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 9660
 aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 9720
 aaaggccgctg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaa 9780
 tcgacgctca agtcagaggt ggcaaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 9840
 25 ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc 9900
 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgt ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 9960
 ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccg 10020
 ccgctcgcgc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc 10080
 30 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 10140
 agagtctctg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 10200
 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctctgat ccggcaaaaca 10260
 35 aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 10320
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa 10380
 ctcacgtaa gggatthtgg tcatgcatga tatatctccc aatttggtga gggcttatta 10440
 tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtg agcaattatg 10500
 40 tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgcgcgca agcggcgtcg gcttgaacga 10560
 atttctagct agacattatt tgccgactac cttgggtgac tcgcctttca cgtagtggac 10620
 aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcगतct tcttctgtc caagataagc 10680
 ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggcccgc aggcgctcca ttgccagtc 10740
 45 ggcagcgaca tccttcggcg cgatthtggc ggttactgcg ctgtaccaa tgcgggaca 10800
 cgtaagcact acatthtgcct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgttaa 10860
 ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc 10920
 cgctggacct accaaggcaa cgetatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc 10980
 50 aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc 11040
 aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt gcacaacaat 11100
 ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgt ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag 11160
 gtcgttgatc aaagctcgc gcgttgtht atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa 11220
 55 atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagecgtaca aatgtacggc 11280
 cagcaacgct ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact acctctgata gttgagtcga 11340
 tacttcggcg atcaccgctt ccccatgat gtttaacttt gtttagggc gactgcctg 11400
 60 ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg 11460
 ctgcttgat gccgaggca tagactgtac ccaaaaaaa cagtcataac aagccatgaa 11520
 aaccgccact gcg 11533

65 <210> 4
 <211> 11533

ES 2 289 529 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Vector de expresión UH201

<400> 4

```

10      ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga      60
      ttatttctaat aaacgctctt ttctcttagg tttaccggcc aatataatcct gtcaaacact      120
      gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca      180
      tgattacgcc aagcttgcac gccgatcccc cccactccgc cctacactcg tataatatatg      240
15      cctaaacctg ccccgttcct catatgtgat attattattt cattattagg tataagatag      300
      taaacgataa ggaagacaa tttattgaga aagccatgct aaaatataga tagatatacc      360
      ttagcaggtg tttattttac aacataacat aacatagtag ctagccagca ggcaggctaa      420
      aacatagtat agtctatctg cagggggtag ggtcgactct agactagtgg atccgctgaa      480
20      gctagcttgg gtcccgcctc gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc      540
      gaatcgggag cggcgatacc gtaaagcacg aggaagcggg cagcccattc gccgccaagc      600
      tcttcagcaa tatcacgggt agccaaacgct atgtcctgat agcggctccg cacacccagc      660
      cggccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag      720
25      gcategccat gggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg      780
      aacagttccg ctygcgcgag ccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga      840
      ccggcttcca tccgagtacg tgctcgtctg atcgatggt tcgcttgggt gtcgaatggg      900
      caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatactttc      960
30      tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgcc caatagcagc      1020
      cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgctg agcacagctg cgcaaggaac gcccgctcgtg      1080
      gccagccacg atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggctg      1140
      gtcttgacaa aaagaaccgg gcgccctgct gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag      1200
35      cagccgattg tctgttgtgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga      1260
      gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc caagctcca tgggcccctg actagagctg      1320
      agatccgata tcgcccgggc tcgactctag aggatccaag ctactctgct taaattcaca      1380
40      aaaagagaaa agtaagacca aaggaataaa tcctcctcaa accaaaaaca catcatacaa      1440
      aatcatcaaa cataaatctc cagatgtatg agcaccaatc cagttataca acactcttaa      1500
      caccaaatca acagatttaa cagcgaata agcttaagcc catacaatta tccgatccaa      1560
      acaaatataa tcgaaaccgg cagaggaata agcaagtga tcaaaaagta tgggacgagg      1620
45      aagaagatga tacctgaatg agaaagtcaa taaccttgac ccgaatcgtt ttgaagaaaa      1680
      tggagaaaat cgttgtatg gaataaaatc ttcgaatgat gagatatatg atctcttgg      1740
      tgtcagtcac atggcacacg ctatcaattt agaaaaacgc ggtggttggg caccagaatt      1800
      actacttctc ggtctgattt ggtcatatcc gtattaagtc cggttaatat ttccataac      1860
50      tggggtttga acattcgggtt tctttttttc agttagtcg atttggagtt ttgagtatgg      1920
      aaaaataata ctgaatttat ttgttcaaac tgttttgaa aaaatatttc ccttaattac      1980

```

55

60

65

ES 2 289 529 T3

5 gaatataatt aaaattttaa aattcatttt attagatcctt ggtaattcgg gtttaattgca 2040
 ttaatgaatt tcggtttaag tcggttttcg gtttttatgt cccaccacta tctacaaccg 2100
 atgatcaacc ttatctccgt attcaccaca aacagtcac actctcactt gacacaaaaa 2160
 ctcttttgtc tccgtctctc tgtctctcgg atccccgggt aggtcagtcc cttatgttac 2220
 gtcctgtaga aacccaacc cgtgaaatca aaaaactcga cggcctgtgg gcattcagtc 2280
 tggatcgcga aaactgtgga attggtcagc gttgggtgga aagcgcgta caagaaagcc 2340
 10 gggcaattgc tgtgccagga gtttttaacg atcaagttcg ccgatgccag atattcgtaa 2400
 ttatgccggc aacgtcttgg tatcagcgcc gaagtcttta ttccgaaagg ttgggcaggc 2460
 cagegtatcg tgctgcgttt cgatgcggtc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat 2520
 caggaagtga tggagcatca gggcggtat acgccatttg aagccgatgt cacgccgat 2580
 15 gttattgccg ggaanaagtgt acgtaagttt ctgcttctac ctttgatata tatataataa 2640
 ttatcattaa ttagtagtaa tataatattt caaatatttt tttcaaaata aaagaatgta 2700
 gtatatagca attgcttttc tgtagtttat aagtgtgtat attttaattt ataacttttc 2760
 taatatatga ccaaaatttg ttgatgtgca ggtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg 2820
 20 aactggcaga ctatcccgcc gggaaatggtg attaccgacg aaaacggcaa gaaaaagcag 2880
 tcttacttcc atgatttctt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat gctctacacc 2940
 acgccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtggtgacgc atgtcgcgca agactgtaac 3000
 cacgcgtctg ttgactggca ggtggtggcc aatggtgatg tcagcgtga actgcgtgat 3060
 25 gcggatcaac aggtggttgc aactggacaa ggcactagcg ggactttgca agtgggtgaat 3120
 ccgcacctct ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac tgtgcgtcac agccaaaagc 3180
 cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc ggtcagtggc agtgaagggc 3240
 gaacagttcc tgattaacca caaaccttc tactttactg gctttggtcg tcatgaagat 3300
 30 gcggacttac gtggcaaagg attcgataac gtgctgatgg tgcacgacca cgcattaatg 3360
 gactggattg gggccaactc ctaccgtacc tcgcattacc cttacgctga agagatgctc 3420
 gactgggcag atgaacatgg catcgtggtg attgatgaaa ctgctgctgt cggctttaac 3480
 ctctctttag gcattggttt cgaggcgggc aacaagccga aagaactgta cagcgaagag 3540
 35 gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga ttaaagagct gatagcgcgt 3600
 gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcc aacgaaccgga taccctccg 3660
 caagtgcacg ggaatatttc gccactggcg gaagcaacgc gtaaaactcga cccgacgcgt 3720
 ccgatcacct gcgtcaatgt aatgttctgc gacgctcaca ccgataccat cagcgatctc 3780
 40 tttgatgtgc tgtgcctgaa ccgttattac ggatgggatg tccaaagcgg cgatttggaa 3840
 acggcagaga aggtactgga aaaagaactt ctggcctggc aggagaaact gcacagccg 3900
 attatcatca ccgaatacgg cgtggatagc ttagccgggc tgcaactcaat gtacaccgac 3960
 atgtggagtg aagagtatca gtgtgcatgg ctggatatgt atcaccgcgt ctttgatcgc 4020
 45 gtcagcgcgg tcgtcgggtga acaggtatgg aatttcgccg attttgcgac ctcgcaaggc 4080
 atattgcgcg ttggcggtaa caagaaaggg atcttctact gcgaccgcaa accgaagtcg 4140
 gcggcttttc tgetgcaaaa acgctggact ggcattgaact tcggtgaaaa accgcagcag 4200
 ggaggcaaac aatgaatcaa caactctctt ggcgcaccat cgtcggctac agcctcggga 4260
 50 attgctaccg agctcggtac ccggcgcaaa aatcaccagt ctctctctac aaatctatct 4320
 ctctctattt ttctccagaa taatgtgtga gtagttccca gataagggaa ttagggttct 4380
 tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaacctt tagtatgtat ttgtatttgt 4440
 aaaactcttc tatcaataaa atttctaatt ctaaaaacca aaatccagtg accgggtacc 4500
 55 gagctcgaat tcaactggccg tcgttttaca acgactcagc agcttgacag gaggcccgat 4560
 ctagtacat agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgcgcgc tatattttgt 4620
 tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactcfaat cataaaaacc catctcataa 4680

60

65

ES 2 289 529 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata 4740
 tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt 4800
 ttgaacgatc ggggatcacc cgggtctgtg gcgggaaactc cacgaaaata tccgaacgca 4860
 gcaagatcgg tcgatcgact cagatctggg taactggcct aactggcctt ggaggagctg 4920
 gcaactcaaa atccctttgc caaaaaccaa catcatgcca tccaccatgc ttgtatccag 4980
 ccgcgcgcaa tgtaccccgc gctgtgtatc ccaaagcctc atgcaaccta acagatggat 5040
 cgtttggang gcctataaca gcaaccacag acttanaacc ttgcccctcc atagacttaa 5100
 gcaaatgtgt gtacaatgta gatcctaggc ccaacctttg atgcctatgt gacacgtaaa 5160
 cagtactctc aactgtccaa tcgtaagcgt tcctagcctt ccagggccca gcgtaagcaa 5220
 taccagccac aacaccctca acctcagcaa ccaaccaagg gtatctatct tgcaacctct 5280
 ctaggtcacc aatccactct tgtggtgttt gtggctctgt cctaaagttc actgtagacg 5340
 tctcaatgta atggttaacg atgtcacaaa ccgcggccat atcggctgct gtagctggcc 5400
 taatctcaac tggctctctc tccggagaca tgtcgagatt atttggattg agagtgaata 5460
 tgagactcta attggatacc gagggaatt tatggaacgt cagtggagca tttttgacaa 5520
 gaaatatttg ctagctgata gtgaccttag ggcacttttg aacgcgcaat aatggtttct 5580
 gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaaccgcgg ctgagtggct ccttcaacgt 5640
 tgccggttctg tcagtccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc gggggtcata 5700
 acgtgactcc cttaatctct cgtcatgat cagattgtcg tttcccgcct tcagtttaa 5760
 ctatcagtggt ttgacaggat cctgcttggg aataattgtc attagattgt ttttatgcat 5820
 agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgtaa ttcagtacat 5880
 taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata 5940
 tatcctgccca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcacia aatcaccacg 6000
 cgttaccacc acgcccggcc gccgcatggt gttgaccgtg ttcgcccgca ttgcccagtt 6060
 cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcggggcg gagggccgca agggcccagg 6120
 cgtgaagttt ggcccccgcc ctaccctcac cccggcacag atcgcgcacg cccgcgagct 6180
 gatcgaccag gaaggccgca ccgtgaaaga ggcggctgca ~~ctgcttggcg~~ ~~tgcatcgtctc~~ 6240
 gaccctgtac cgcgcaactg agcgcagcga ggaagtgacg cccaccgagg ccaggcggcg 6300
 cgggtgccttc cgtgaggacg cattgaccga ggcgcagcgc ctggcggccg ccgagaatga 6360
 acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttcatt 6420
 accgaagaga tcgaggcgga gatgatcgcg gccgggtacg tgttcgagcc gccgcgcac 6480
 gtctcaaccg tgcggctgca tgaaatcctg gccggtttgt ctgatgcaa gctggcggcc 6540
 tggcccggca gcttggccgc tgaagaaacc gagcgcgcgc gtctaaaaag gtgatgtgta 6600
 tttgagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata tgatgcgatg agtaataaa 6660
 caaatacgca aggggaacgc atgaaggta tcgctgtact taaccagaaa ggcgggtcag 6720
 gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgcctgca actcgcggg gccgatgttc 6780
 tgttagtcga ttccgatccc cagggcagtg cccgcgattg ggccggcgtg cgggaagatc 6840
 aaccgctaac cgttgtcggc atcgaccgcc cgacgattga ccgcgacgtg aaggccatcg 6900
 gccggcgcga cttegtagt atcgacggag gcccccaggc ggccgacttg gctgtgtccg 6960
 cgatcaaggc agccgacttc gtgctgatc cggtgcagcc aagcccttac gacataggg 7020
 ccaccgcca cctgggtggag ctggttaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac 7080
 aagcggcctt tgtcgtgtcg cgggcgatca aaggcacgcg catcggcggg gaggttgcg 7140
 aggcgctggc cgggtacgag ctgcccattc ttgagtccc tatcacgcag cgcgtgagct 7200
 acccaggcac tgcccgcgcc ggcacaaccg ttcttgaatc agaaccggag ggcgacgctg 7260
 cccgcgaggt ccaggcgtg gccgctgaaa ttaaatcaaa actcatttga gttaatgagg 7320
 taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcc ggccgtccga gcgcacgcag 7380

ES 2 289 529 T3

5 cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca gccatgaagc gggtaactt 7440
 tcagttgccg gcgaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgcc aaggcaagac 7500
 cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca gagtaaata gcaaatgaat 7560
 10 aatgagtag atgaatttta gcggttaaag gaggggcat ggaaaatcaa gaacaaccag 7620
 gcaccgacgc cgtggaatgc cccatgtgtg gaggaacggg cggttggcca ggcgtaagcg 7680
 gctgggttgt ctgccggccc tgcaatggca ctggaacccc caagcccagc gaatcggcgt 7740
 gagcggctgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg gcgctgggtg atgacctggc 7800
 ggagaagtgt aaggccgcgc aggcgcgcca gcggaacgc atcgaggcag aagcacgccc 7860
 cggtagaatc tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaa gaatcccggc aaccgcggc 7920
 agccgggtgc ccgtcgatta ggaagccgccc caaggcgcag gagcaaccag atttttctgt 7980
 15 tccgatgctc tatgacgtgg gcaccgcga tagtcgcagc atcatggacg tggccgtttt 8040
 ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgagc ttccagacgg 8100
 gcacgtagag gtttccgag ggcggccgg catggccagt gtgtgggatt acgacctggc 8160
 actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga taccgggaag ggaagggaga 8220
 20 caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagttct gccggcgagc 8280
 cgatggcggg aagcagaag acgacctggt agaacctgc attcggtta acaccacgca 8340
 cgttgccatg cagcgtacga agaagccaa gaacggcgc ctggtgacgg tatccgagg 8400
 tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcga accgggcggc cggagtacat 8460
 25 cgagatcgag ctgctgatt gtagtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccgacgt 8520
 gctgacgggt caccgccatt acttttctgat cgatcccggc atcgccggt ttctctaccg 8580
 cctggcacgc cgcgcgcag gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga 8640
 acgcagtggc agcgcgggag agttcaagaa gttctgttcc accgtgcgca agctgatcgg 8700
 30 gtcaaatac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg gggcaggctg gcccgatcct 8760
 agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgagg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga 8820
 gcagatgcta gggcaaatg ccctagcagg ggaaaaaggc cgaaaaggtc tcttctctgt 8880
 ggatagcacg tacattggga acccaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg 8940
 35 gaacccaag ccgtacattg ggaacgggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa 9000
 aaaaggcgat ttttccgctt aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaaccgcct 9060
 ggctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgcctacct 9120
 40 tcggtcgctg cgtccctac gccccccgc ttcgctcgg cctatcgcg cgcctggccg 9180
 ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccagg cgcggaacag ccgcgcgctc 9240
 gccactcgac cgcggcgcc cacatcaagg caccctgct cgcgcgtttc ggtgatgacg 9300
 gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg 9360
 45 ccgggagcag acaagccgct cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgag 9420
 ccatgaccca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg cggcatcaga 9480
 gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaata ccgcacagat gcgtaaggag 9540
 aaaataccgc atcagcgcct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctgt 9600
 50 tcggtcgcg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 9660
 aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 9720
 aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaa 9780
 tcgacgctca agtcagaggt ggcaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 9840
 55 cctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 9900
 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtc ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 9960
 ttcggtgtag gtcggtcgt ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 10020
 ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc 10080

60

65

ES 2 289 529 T3

gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 10140
 agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 10200
 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat cgggcaaaca 10260
 5 aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgc ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 10320
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacyaaaa 10380
 ctcaagttaa gggattttgg tcatgcatga tatactctccc aatttgtgta gggcttatta 10440
 10 tgcaagctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtg agcaattatg 10500
 tgcttagtgc atctaacgct tgagttaagc cgcgcgcga agcggcgtcg gcttgaacga 10560
 atttctagct agacattatt tgccgactac cttggtgatc tgcctttca cgtagtggac 10620
 aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggg caagcgatct tcttcttgc caagataagc 10680
 15 ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggcccggc aggcgctcca ttgccagtc 10740
 ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgccc ggttactgcg ctgtaccaa tgcgggacaa 10800
 cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcggggc ggcgagttcc atagcgttaa 10860
 ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc 10920
 20 cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc 10980
 aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc 11040
 aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt gcacaacaat 11100
 ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgtc ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag 11160
 25 gtcggtgatc aaagctcggc gcggtgtttc atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa 11220
 atcaatatca ctgtgtggct tcaggccggc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc 11280
 cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaact acctctgata gttgagtcga 11340
 tacttcggcg atcaccgctt ccccatgat gtttaacttt gttttagggc gactgcctg 11400
 30 ctgcgtaaca tcggtgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg 11460
 ctgcttggat gcccagggca tagactgtac cccaaaaaa cagtcataac aagccatgaa 11520
 aaccgccact gcg 11533

35 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 45 <400> 5

acggatccga gagacagaga gacggagaca aaa

33

50 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 60 <400> 6

gcggatccaa gcttactgc ttaaattc

28

65