



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 245**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04763617 .0**

96 Fecha de presentación : **29.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1651769**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Utilización de constructos que comprenden motivos de secuencias de recombinación para la expresión génica mejorada en musgo.**

30 Prioridad: **31.07.2003 EP 03017343**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **GREENOVATION BIOTECH GmbH**
Bötzingenstrasse 29B
79111 Freiburg, DE

72 Inventor/es: **Gorr, Gilbert**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 245 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

Utilización de constructos que comprenden motivos de secuencias de recombinación para la expresión génica mejorada en musgo

5 La presente invención se refiere métodos y materiales para mejorar la expresión génica en células eucariotas, particularmente en células vegetales comprendidas en musgos, tales como células del protonema de musgos.

La amplificación génica para mejorar la expresión de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamíferos es una estrategia usada generalmente (Herlitschka et al. (1996) *Protein Expr. Purif.* 8, 358-364; Ringold et al. (1981) *J. Mol. Appl.*).

10 En plantas, la puesta en práctica de estrategias de amplificación génica es problemática debido a sucesos de silenciamiento que se pueden disparar mediante integraciones de múltiples copias de ADN heterólogo (Asaad et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 22, 1067-1085). Recientemente, para superar estas limitaciones, se han desarrollado estrategias para la amplificación génica en plantas. El elemento genético *aps* que actúa en *cis* se aisló de una región espaciadora no transcrita de ADN ribosómico del tabaco. Este elemento espaciador se fusionó a genes informadores de interés y dio como resultado un aumento de los números de copias del gen heterólogo de interés y mayores niveles de expresión de proteínas heterólogas a partir de ellos (Borisjuk et al. (2000) *Nature Biotechnol.* 18, 1303-1306).

Klimyuk et al. han descrito una estrategia adicional que implica la expresión de proteínas heterólogas vía corte y empalme en *trans* (documento WO 02/097080).

20 Hasta la fecha, se sabe poco sobre la correlación del número de copias y la expresión de genes heterólogos en plantas de musgo transgénicas. El uso de musgos para la producción de proteínas recombinantes es una tecnología bien consolidada (documento EP1206561, Gorr et al. 2001, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363 Supl.: R 85). Típicamente, en el genoma del tejido de musgo transformado se puede integrar un número cualquiera desde 1 hasta alrededor de 50 copias del plásmido transformante (Schaefer (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 477-501). Dependiendo del diseño de los constructos transformantes empleados, se puede producir una recombinación homóloga, esto es, un suceso de integración seleccionado, y/o una recombinación heteróloga, esto es, un suceso de integración aleatorio o no seleccionado. De este modo, el uso para la transformación de secuencias de ADN (es decir, comprendidas por secuencias codificantes o no codificantes) que son homólogas con las secuencias de DNA genómico de un musgo puede dar como resultado uno o más sucesos de recombinación homóloga vía la integración del ADN introducido o transformante en el locus genómico del ADN homólogo. El uso de secuencias de ADN (es decir, comprendidas por secuencias codificantes o no codificantes) para la transformación que carecen de cualquier homología apreciable con una secuencia de ADN genómico de un musgo puede dar como resultado uno o más sucesos de recombinación heteróloga vía la integración en el genoma, de manera al azar, del ADN introducido. El musgo es el único sistema vegetal conocido que presenta una frecuencia elevada recombinación homóloga (Strepp et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4368-4373; Schaefer (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 477-501). Este atributo aparentemente único de los musgos se ha usado para la introducción seleccionada de genes. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito la amplificación de la expresión génica aumentando el número de copias de plásmidos de interés a fin de generar mayores niveles de proteína por unidad de masa de tejido de musgo establemente transformado.

40 Sorprendentemente, se ha encontrado que transformando, típicamente cotransformando, células (protoplastos) de tejido de musgo con al menos dos secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que comprenden al menos un conjunto de secuencias de recombinación, se da como resultado un incremento del número de copias integradas de constructos de ácidos nucleicos heterólogos en el tejido regenerado, tales como células comprendidas en el protonema de musgos, lo que a su vez está correlacionado con un incremento de los niveles de expresión proteica.

45 Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para la producción de proteínas de interés en células comprendidas en tejido de musgo.

Según la presente invención, se proporciona un método para amplificar la expresión génica en una célula de una planta de musgo, que comprende

50 1) proporcionar al menos un primer constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por una primera secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por una segunda secuencia de recombinación en la misma orientación que la primera;

55 2) proporcionar al menos un segundo constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por dicha segunda secuencia de recombinación, y está flanqueado en

el extremo 3' del dicho constructo por dicha primera secuencia de recombinación en la misma orientación que la segunda; y

3) transformar en la célula de la planta de musgo al menos dicho primer y dicho segundo constructo de ácido nucleico heterólogo.

5 El destinatario experto de este documento apreciará que, una vez los dichos al menos dos constructos heterólogos se transformen en la célula de la planta de musgo, tal como un protoplasto de musgo, por ejemplo un protoplasto de *Physcomitrella patens*, a la que se le permite regenerarse entonces en protonema de musgo, por ejemplo de *Physcomitrella patens*, sufrirán una recombinación entre sí muchas veces después. Este proceso, una vez iniciado en la célula de la planta de musgo, incrementa el número de copias de los constructos de ADN transformante integrados de la invención allí.

De este modo, como un aspecto adicional de la invención, se proporciona un protonema de musgo, preferiblemente protonema de *Physcomitrella patens*, comprendido por células transformadas de forma estable, más preferiblemente cotransformadas con al menos dos constructos complementarios de la invención.

15 Por último, son medibles incrementos significativos en el nivel de proteína heteróloga de interés procedente del al menos un gen heterólogo de interés por encima y más allá de los niveles de proteína que son medibles en células de protonema de musgo procedentes de constructos transformantes convencionales que carecen de las características de los constructos de la invención. La al menos primera y la al menos segunda secuencias de recombinación forman un conjunto complementario que hace posible que los constructos de la invención se recombinan entre sí. Naturalmente, el destinatario experto de este documento apreciará que se pueden emplear constructos de la invención en los que se puede usar uno o más conjuntos complementarios de secuencias de recombinación, dependiendo de cuántas de las secuencias nucleotídicas de interés iguales o diferentes se pretenden utilizar para la producción proteica, tal como 1, 2, 3, 4, ó 5 o más conjuntos. Preferiblemente, por facilidad de conveniencia, se usa un único conjunto complementario de secuencias de recombinación.

25 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un conjunto de vectores de ácido nucleico adecuados para amplificar la expresión génica en una célula de una planta de musgo, en el que dicho conjunto de vectores de ácido nucleico comprende i) al menos un primer constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por una primera secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por una segunda secuencia de recombinación en la misma orientación que la primera; y ii) al menos un segundo constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga enlazada operablemente a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por dicha segunda secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por dicha primera secuencia de recombinación en la misma orientación que la segunda.

35 De este modo, los dos constructos comprenden secuencias de recombinación complementarias similares, localizadas en diferentes sitios allí, que hacen posible o permiten que los constructos se recombinen entre sí in situ en células de protonema de musgo transformadas comprendidas en el protonema de musgo, por ejemplo protonema de *Physcomitrella patens*. Preferiblemente, los constructos de la invención están en forma lineal.

40 Tales constructos se pueden usar para transformar protoplastos de musgo en al menos dos sucesos de transformación separados, en el que un primer suceso de transformación se separa en el tiempo de un segundo suceso de transformación, o los constructos de la invención se pueden cotransformar en protoplastos de musgo que entonces se les permite o se dejan regenerar en protonema de musgo. Preferiblemente, el suceso de transformación comprende cotransformar protoplastos de musgo con al menos dos constructos de la invención como se describe anteriormente.

45 La secuencia de recombinación utilizada en constructos de la invención puede ser cualquier secuencia seleccionada de cualquier organismo, tal como de ADN genómico vegetal, tal como ADN genómico, ADNc, regiones intrónicas o exónicas o regiones no codificantes o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo de *Physcomitrella patens*. El ADN genómico adecuado para uso como secuencia de recombinación puede comprender ADN de un exón o un intrón, o un híbrido de los dos. Preferiblemente, la secuencia de recombinación está formada por ADN procedente de un intrón o región no codificante de ADN. Como se explica aquí, la orientación de las dos secuencias de recombinación flanqueantes está preferiblemente en la misma orientación, por ejemplo en la dirección 5' a 3' o en la dirección 3' a 5' en ambos constructos transformantes, a pesar de que la localización real de las secuencias de recombinación en los dos constructos es diferente una de la otra, como se alude anteriormente. Naturalmente, el destinatario experto de este documento apreciará que los constructos heterólogos de la invención comprenderán secuencias de recombinación en la posición y orientación apropiadas que permitan que se produzcan los sucesos de recombinación entre los dos. Las secuencias nucleotídicas de recombinación de los constructos de la invención pueden ser de cualquier longitud, con la condición de que sean capaces de provocar o permitir que se produzcan los sucesos de recombinación. Las longitudes adecuadas para las secuencias de recombinación empleadas en los

constructos de la invención oscilan de 25 - 1000 nucleótidos de longitud o más; de 25 - 650 nucleótidos de longitud; de 50 - 650 nucleótidos de longitud; de 100 - 400 nucleótidos de longitud; o de 200 - 400 nucleótidos de longitud, por ejemplo de alrededor de 200 +/- 50 nucleótidos de longitud. El destinatario experto de este documento apreciará que la longitud de las secuencias de recombinación de los constructos de la invención puede variar dependiendo del diseño.

Como un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula de musgo que comprende el conjunto de vectores de ácido nucleico de la invención, protonema de musgo compuesto de dichas células de musgo, y/o plantas de musgo que comprenden el conjunto de vectores de ácido nucleico de la invención, particularmente una célula de protonema de musgo, protonema de musgo compuesto de células de protonema que comprenden el conjunto de vectores de ácido nucleico de la invención, y/o plantas de musgo que comprenden el conjunto de vectores de ácido nucleico de la invención que son *Physcomitrella patens*. Ahora se explicarán con más detalle los aspectos particulares de la invención.

Definiciones

El término "heterólogo" se usa más abajo de forma amplia para indicar que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en protoplastos de musgo usando ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. Un gen heterólogo puede aumentar la expresión de una proteína de interés de un gen equivalente endógeno, es decir, aquel que normalmente realiza la misma función o una similar; o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno o a otra secuencia. El ácido nucleico heterólogo a una célula puede ser de origen natural en protoplastos de musgo de ese tipo, variedad o especie. De este modo, el ácido nucleico heterólogo puede comprender una secuencia codificante de, o derivar de, un tipo particular de organismo, tal como una especie de mamífero, p.ej. de especie humana, ovina, bovina, equina, o porcina, colocada en el contexto de un protoplasto de musgo, tal como un protoplasto derivado de *Physcomitrella patens*. Una posibilidad adicional es que se coloque una secuencia de ácido nucleico en un protoplasto de musgo en el que ella o un homólogo se encuentre de forma natural, pero en el que la secuencia de ácido nucleico esté enlazada y/o sea adyacente a un ácido nucleico que no se produce de forma natural en la célula, o células de ese tipo o especie o variedad de planta, tal como operablemente enlazada a una o más secuencias reguladoras, tal como una secuencia promotora, para el control de la expresión.

"Gen", excepto que lo demande de otro modo el contexto, se refiere a cualquier ácido nucleico que codifique información genética para la traducción en un péptido, polipéptido o proteína.

"Vector" se define para incluir, entre otros, cualquier plásmido, cósmido, fago, o vector vírico en forma lineal o circular, bicatenario o monocatenario, que puede o no ser autotransmisible o movilizable, y que puede transformar un hospedante procarionta o eucariota y existe extracromosómicamente (p.ej., plásmido que se replica autónomo con un origen de replicación). Se incluyen específicamente vectores lanzadera, mediante los cuales se quiere decir un vehículo de ADN capaz, de forma natural o mediante diseño, de la replicación en dos organismos hospedantes diferentes, que se pueden seleccionar de actinomicetos y especies relacionadas, bacterias y células eucariotas (p.ej., plantas superiores, musgos, de mamífero, de levadura, o fúngica).

"Vector de expresión" se refiere a un vector en el que un ácido nucleico está bajo el control de, o está enlazado operablemente a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula hospedante tal como una célula microbiana o un protoplasto de musgo. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional, que funciona en múltiples hospedantes. En el caso de ADN genómico o subgenómico, éste puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores, y, en el caso de ADNc, éste puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula hospedante.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos a partir de la cual se puede iniciar la transcripción de ADN operablemente enlazado en dirección 3' (es decir, en la dirección 3' en la hebra sentido de ADN bicatenario).

"Operablemente enlazado" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, situado y orientado adecuadamente para que se inicie la transcripción desde el promotor.

El término "inducible", como se aplica a un promotor, es bien entendido por los expertos en la técnica. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible se "enciende" o incrementa en respuesta a un estímulo aplicado. La naturaleza del estímulo varía entre promotores. Algunos promotores inducibles provocan niveles bajos o indetectables de expresión (o de ninguna expresión) en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles provocan la expresión constitutiva deseable en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión a partir de cualquier promotor inducible aumenta en presencia del estímulo correcto.

La invención también abarca el uso de una variante de cualquiera de estas secuencias. Una proteína variante comparte homología con, o es idéntica a, todas o parte de las secuencias explicadas anteriormente. Hablando de

forma general, donde sea que se use el término aquí, las variantes pueden ser:

(i) variantes homólogas de origen natural de la proteína relevante,

(ii) variantes homólogas artificialmente generadas (derivados) que se pueden preparar por la persona experta a la luz de la presente descripción, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida al sitio o al azar, o mediante síntesis directa. Preferiblemente, el ácido nucleico variante, que codifica el polipéptido variante, se genera directa o indirectamente (p.ej. vía una o más etapas de amplificación o de replicación) a partir de un ácido nucleico original. Los cambios a la secuencia de ácidos nucleicos pueden producir un derivado por medio de uno o más de adición, inserción, supresión o sustitución de uno o más nucleótidos en el ácido nucleico, conduciendo a la adición, inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado. La mutación deseable puede ser mutagénesis al azar o dirigida al sitio, a fin de alterar la actividad (p.ej. especificidad) o estabilidad del polipéptido codificado. Los cambios se pueden hacer por medio de variación conservativa, es decir, sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. También se incluyen variantes que tienen sustituciones no conservativas. En regiones que son críticas a la hora de determinar la conformación o actividad de los péptidos, tales cambios pueden conferir propiedades ventajosas al polipéptido, por ejemplo estabilidad o especificidad alteradas.

La similitud u homología en el caso de variantes se establece preferiblemente vía comparaciones de secuencias realizadas usando FASTA y FASTP (véase Pearson y Lipman, 1988. *Methods in Enzymology* 183: 63-98). Los parámetros se ajustan preferiblemente, usando la matriz por defecto, según lo siguiente:

Gapopen (penalización para el primer resto en un salto): -12 para proteínas / -16 para ADN

Gapext (penalización para restos adicionales en un salto): -2 para proteínas / -4 para ADN

Longitud de la palabra de KTUP: 2 para proteínas / 6 para ADN.

La homología puede ser a nivel de secuencia nucleotídica y/o a nivel de secuencia de aminoácidos codificados. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos y/o de aminoácidos comparte al menos alrededor de 75%, u 80% de identidad, lo más preferible al menos alrededor de 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad.

La homología se puede evaluar también mediante uso de una metodología de sondeo (Sambrook et al., 1989). Una fórmula habitual para calcular las condiciones de restricción requeridas para lograr la hibridación entre moléculas de ácidos nucleicos de una homología de secuencia específica es $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6\text{Log} [\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{G+C}) - 0,63 (\% \text{de formamida}) - 600/n^\circ \text{ de pb en el dúplex}$. Como ilustración de la fórmula anterior, usando $[\text{Na}^+] = [0,368]$ y 50% de formamida, con un contenido de GC de 42% y un tamaño medio de sonda de 200 bases, la T_m es 57°C . La T_m de un dúplex de ADN disminuye un $1-1,5^\circ\text{C}$ cada 1% de disminución de la homología. De este modo, se observarían dianas con más de alrededor de 75% de identidad de secuencia usando una temperatura de hibridación de 42°C .

Uso en plantas de musgo

Como se describe más abajo, en sus diversos aspectos, la invención se empleará generalmente en protoplastos de musgo, usando ácidos nucleicos que codifican proteínas de interés.

Los promotores adecuados que operan en protoplastos de musgo incluyen el virus 35S del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). Otros ejemplos se describen en la página 120 de Lindsey y Jones (1989) *Plant Biotechnology en Agriculture@ Pub. OU Press, Milton Keynes, UK*. El promotor se puede seleccionar para que incluya uno o más motivos de secuencias o elementos que confieran el control de desarrollo y/o regulador específico de tejidos de la expresión. Los promotores vegetales inducibles incluyen el promotor inducido por etanol de Caddick et al (1998) *Nature Biotechnology* 16: 177-180.

Un terminador se contempla como una secuencia de ADN al final de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Estos elementos son secuencias no traducidas en 3' que contienen señales de poliadenilación, que actúan provocando la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de transcritos primarios. Para la expresión en células vegetales, la secuencia del terminador transcripcional de nopalina sintasa (A. Depicker et al., 1982, *J. of Mol. & Applied Gen.* 1:561-573) puede servir como una señal de terminación transcripcional, como lo puede ser el terminador de CaMV 35S (Topfer et al. (1987) *NAR* 15, 5890).

Si se desea, se pueden incluir marcadores genéticos seleccionables en constructos convencionales adicionales, tales como plásmidos circulares, o en constructos de ADN linealizados adicionales que se cotransforman en una célula de musgo de la invención, tales como aquellos que confieren fenotipos seleccionables tales como resistencia a antibióticos o a herbicidas (p.ej., canamicina, higromicina, fosfotricina, clorosulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomicina, imidazolinonas y glifosato).

La presente invención también proporciona métodos que comprenden la introducción de tales constructos, que comprenden secuencias heterólogas apropiadas, en una célula de una planta de musgo, y/o la inducción de la expresión de un constructo de la invención en una célula de plantas de musgo, mediante aplicación de un estímulo adecuado, p.ej. un inductor exógeno eficaz. Las células de plantas de musgos adecuadas incluyen el protoplasto de musgos, y las células comprendidas en el protonema, tales como las derivadas de *Physcomitrella patens*.

El ácido nucleico se puede introducir en protoplastos de musgo usando cualquier tecnología adecuada, tal como captación de ADN mediada por PEG, como se describe aquí, bombardeo con partículas o microproyectiles (documentos US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616) microinyección (documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green et al. (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), electroporación (documentos EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser), otras formas de captación directa de ADN (documentos DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediada por liposomas (p.ej. Freeman et al. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de tratamiento con vórtex (p.ej. Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d)). Los métodos físicos para la transformación de células vegetales se repasan en Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11.

Se prefiere la electroporación, la captación de ADN mediada por PEG, y la captación de ADN directa. Se prefiere especialmente el procedimiento de captación de ADN mediado por PEG modificado, como se describe en los ejemplos aquí.

La elección particular de una tecnología de transformación estará determinada por su eficiencia para transformar ciertas especies de musgos, así como la experiencia y preferencia de la persona que pone en práctica la invención con una metodología particular de elección. Será manifiesto para la persona experta que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en protoplastos de musgos no es esencial para la invención. Sin embargo, se prefiere el uso del sistema de transformación de ADN mediado por PEG descrito aquí.

De este modo, diversos aspectos de la presente invención proporcionan un método para transformar un protoplasto de musgo, que implica la introducción de un constructo a base de ácido nucleico heterólogo de la invención como se describe aquí en un protoplasto de musgo, y la regeneración del protoplasto en el tejido del protonema, y provocar o permitir la expresión de la proteína a partir de los constructos de la invención. De este modo, el destinatario experto del presente documento puede esperar que la expresión de una proteína dirigida al citosol o a otros compartimientos celulares se puede mejorar usando constructos y métodos de la invención. Preferiblemente, las proteínas recombinantes producidas por los métodos de la invención se segregan en el medio a partir de tejido protonémico transformado de forma estable.

De este modo, empleando los al menos dos constructos de la invención como líneas de producción descritas aquí, se pueden generar números elevados de copias del gen diana, lo que a su vez da como resultado rendimientos elevados de proteína a lo largo del periodo de cultivo en un biorreactor adecuado.

Elección de genes para la mejora

Los genes de interés incluyen aquellos que codifican proteínas que son en sí mismas medicamentos naturales, tales como fármacos o productos veterinarios.

Los ácidos nucleicos heterólogos pueden codificar, *entre otros*, genes de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal. Los polipéptidos producidos se pueden utilizar para producir polipéptidos que se pueden purificar a partir de ellos para uso en cualquier parte. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteína de retinoblastoma, p53, angiostatina, y leptina. Igualmente, los métodos de la invención se pueden usar para producir proteínas reguladoras de mamíferos. Otras secuencias de interés incluyen proteínas, hormonas, tales como la hormona estimulante del folículo, factores de crecimiento, citocinas, seroalbúmina, hemoglobina, colágeno, taumatina, proteínas similares a taumatina, factores de crecimiento epidérmico tales como VEGF, heterodímeros, anticuerpos, inmunoglobulinas, anticuerpos de fusión y anticuerpos de una sola cadena.

Expresión de genes diana

Hablando de forma general, los ácidos nucleicos heterólogos se pueden expresar por cualquier proceso apropiado usado en la técnica, o se pueden transcribir o expresar según lo siguiente:

(i) expresión de ADN "desnudo", por ejemplo que comprende un promotor operablemente enlazado a la secuencia heteróloga en un constructo de la invención,

(ii) expresión a partir de un vector de expresión, tal como un vector replicante. Hablando generalmente, los expertos en la técnica serán capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante. Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Para detalles adicionales, véanse, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al, 1989,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, o Current Protocols in Molecular Biology, segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

5 Como se explica anteriormente, se muestra que la expresión potenciada a partir de constructos de la invención introducidos (preferiblemente a niveles elevados) en los protoplastos de un musgo, preferiblemente a una densidad celular elevada, tal como *Physcomitrella patens*, constructos los cuales están integrados en el genoma, da lugar a ARNm transcrito.

10 De este modo, en un aspecto de la invención, se describe el uso de un protoplasto de musgo transformado capaz de generar ARNm que codifica una proteína diana generada mediante transcripción a partir de un constructo de ácido nucleico introducido de la invención que incluye la secuencia nucleotídica diana enlazada operablemente a un promotor, constructo el cual se introduce en la célula de un organismo.

15 El "ácido nucleico introducido" incluirá así la secuencia de ácido nucleico heteróloga como una secuencia de ADN proporcionada en forma de un constructo de la invención que es capaz de dar lugar a la producción de proteína extracelular a un nivel elevado con relación al nivel de producción de proteína normalmente asociado con la expresión transgénica estable de la dicha secuencia de ADN. En un aspecto de la invención, la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar una proteína que está formada por un péptido señal y/o un péptido de tránsito acoplado a la secuencia proteica o polipeptídica de elección.

El informador puede ser cualquier proteína detectable, tal como un gen marcador, usado habitualmente en la técnica, tal como GUS, GFP, luciferasa, etc. Preferiblemente, el informador es un marcador no invasivo, tal como GFP o luciferasa.

20 Naturalmente, la persona experta en la técnica reconocerá que se puede usar más de una secuencia de ácido nucleico heteróloga en el, o en cada, constructo de la invención, aunque se prefiere una única secuencia en cada caso. Se pueden introducir múltiples vectores (incluyendo cada uno una o más secuencias nucleotídicas que codifican la proteína heteróloga de elección) en los protoplastos de musgo vía métodos de captación de ADN mediados por PEG, como se describe aquí. Esto puede ser útil para producir, p.ej., múltiples subunidades, p.ej., de una enzima.

25 En una realización adicional de la invención, se pueden lograr niveles elevados de proteínas completa y correctamente ensambladas, que consisten en múltiples unidades, influyendo sobre la estequiometría de las diferentes secuencias de ácidos nucleicos codificantes integradas en el genoma.

30 La cantidad de proteína apropiadamente ensamblada que consiste en múltiples subunidades depende de la estequiometría de las subunidades a nivel de la proteína. En el caso de subunidades que se han de dirigir a diferentes compartimientos vía péptidos señal, por ejemplo a la ruta secretora, la estequiometría no está solo influida por la expresión derivada de p.ej. señales promotoras y transcripcionales, sino también por la señal seleccionadora de la diana y el procesamiento de la señal seleccionadora de la diana, p.ej. la escisión apropiada del péptido señal. En este aspecto de la invención, el uso de cantidades no equimolares de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las diferentes subunidades puede ser apropiado para proteínas multiméricas, p.ej. para inmunoglobulinas. Las cantidades no equimolares de ácidos nucleicos codificantes que dan como resultado una estequiometría apropiada de múltiples subunidades de una proteína dimérica o multimérica se pueden lograr así proporcionando constructos apropiadamente diseñados de la invención que permiten el ensamblaje correcto de las diferentes subunidades.

40 Como se describe en los Ejemplos más abajo, la expresión de secuencias heterólogas usando métodos de la invención, cuando se introducen de esta manera, puede dar niveles muy altos del polipéptido diana durante el transcurso del período de expresión, que será generalmente de varios días, dependiendo de los métodos y materiales precisos empleados. Usando los métodos de la invención como se describe aquí, se pueden lograr niveles elevados de producción de polipéptido heterólogo a partir de constructos establemente incorporados de la invención a partir de protonema transformado, preferiblemente cotransformado, regenerado. Todas las referencias dadas aquí, en tanto que pueden ser necesarias para suplementar la presente descripción, se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

45 La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes. Otras realizaciones de la invención serán manifiestas para los expertos en la técnica a la luz de éstas.

50 **EJEMPLOS**

Métodos y Materiales

Material vegetal

Se usó la cepa de tipo salvaje de *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. (Reski et al. 1994). Es un subcultivo de la

cepa 16/14 que fue recogida por H.L.K. Whitehouse en Gransden Wood, Huntingdonshire, UK, y propagada por Engel (1968).

Construcción de vectores

Construcción de pRT101VEGF C3

5 Se cortó ADNc del factor 121 de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF₁₂₁), sin la secuencia líder, como un fragmento *NdeI-SalI* a partir de pCYTEXP-VEGF₁₂₁ (GBF, Braunschweig, Alemania). Este fragmento se acható por la reacción de Klenow y se introdujo en pRT101 (Töpfer et al. 1987), en el sitio de restricción *SmaI*, para formar el plásmido pRT101 VEGF C3. En este constructo, el ADNc de VEGF₁₂₁, menos la secuencia líder, se colocó en dirección 3' del promotor de CaMV 35 S y detrás del terminador de CaMV (Gorr, 1999).

Construcción de pRT101TPVEGF C3

10 La secuencia para el péptido señal de VEGF (señal clasificadora para la secreción) se clona en pRT101 VEGF C3. El ADNc del péptido señal se amplifica a partir del plásmido pRT101 P21 (Gorr, 1999) usando el cebador de 5' MoB323 (5'- ATA CTC GAG GAA GAT GAA CTT TTC TGC CTG TCT TGG -3', SEC ID N° 1) que contiene un sitio de restricción *XhoI*, y el cebador de 3' MoB349 (5'- CTG CCA TGG GTG CAG CCT GGG ACC AC -3', SEC ID N° 2) que contiene el sitio de restricción *NcoI*. El ADN amplificado se digiere con *XhoI* y *NcoI*, y se liga en pRT101 VEGF C3 (digerido con *XhoI/NcoI*), dando como resultado pRT101TPVEGF C3. El plásmido resultante contiene las secuencias codificantes para el péptido señal de VEGF y para VEGF₁₂₁ en el marco bajo control del promotor de CaMV 35 S.

Procedimiento de clonación para la primera secuencia de recombinación de 5' en pRT99

20 La secuencia de 5' de 250 pb del 5° intrón (5'- GCGGAAATGTTTCAGAGTTAAGCGAAATCACAACAAAAGAGATTGGAAGCAGAAGAATTTTTGAGCAGCTGTTCT TAATTCACGCAACGACAACGCTATTAAGTGTATGTGTAGACGATGCACTTTCGTAAGGGATCTAAATTTATT ATATCCCTTCATAACTAGAGGCAAGGCGGAAATCACAAAATATTGGTACCTACGTACTACAGCCTCCAGGATCA AACATAAGAGTGAAACTGGACC -3', SEC ID N° 3) del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa de *Physcomitrella patens* se amplifica a partir de ADN genómico de *Physcomitrella patens* mediante PCR con corrección de *Pfu* (Promega, Alemania) usando el cebador en dirección 5' *RecI_SalI_SacII* (5'-GAG GTC GAC CCG CGG AAA TGT TCA GAG-3', SEC ID N° 4) y el cebador en dirección 3' *Rec1_SmaI* (5'-CTC CCC GGG TCC AGT GTT TCA CTC-3', SEC ID N° 5). Después de la restricción del producto de la amplificación resultante con *SalI* y *SmaI*, se clona en el vector *pRT99* (Töpfer et al. 1988) (digerido con *SalI* y *SmaI*). El plásmido resultante *pRT99RecI* contiene la primera secuencia de recombinación de 5'.

Procedimiento de clonación para la segunda secuencia de recombinación de 3' en pRT99Rec1

35 La secuencia de 3' de 208 pb del 5° intrón: (5'- GGGACCCAAGCGTAAGAAGTCTTATGAAAAAGTTACCTCACAGATTAATAACTAAACATAGGAAAATACCAATGCAC TCCAATGTGTCAATGAGATTAACGCTTGACTAACATGAAAATATAAATATTCACCGAATGAAAGAAAATTAGAAAAC AGGACCTGTAGATTGTAAGAGATAGATTCTTGAGTTAGAAAACACAAATGATTGTCC -3', SEC ID N° 6) del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa de *Physcomitrella patens* se amplifica a partir de ADN genómico de *Physcomitrella patens* mediante PCR con corrección de *Pfu* (Promega, Alemania) usando el cebador en dirección 5' *Rec11_SmaI* ((5'- GAG CCC GGG ACC CAA GCG TAA GAA G- 3', SEC ID N° 7) y el cebador en dirección 3' *RecI_SacII_SstI* (5'- TCT GAG CTC CCG CGG ACA ATC ATT TGT GTTTC- 3', SEC ID N° 8). Después de la restricción del producto de amplificación resultante con *SmaI* y *SstI*, se clona en el vector *pRT99RecI* (digerido con *SmaI* y *SstI*). El plásmido resultante *pRT99Rec11* contiene la primera secuencia de recombinación de 5' y la segunda secuencia de recombinación de 3'.

Construcción de pRT99TPVEGFRecI

45 El casete de expresión que contiene el promotor de CaMV 35S, TPVEGF121 y el terminador de CaMV 35S se corta como un fragmento de *PstI* a partir de pRT101TPVEGF C3. Este fragmento se achata mediante la reacción de Klenow y se introduce en el plásmido pRT99Rec11 digerido con *SmaI* y desfosforilado, dando como resultado el plásmido pRT99TPVEGFRec1.

Procedimiento de clonación para la segunda secuencia de recombinación de 5' en pRT99

50 La secuencia de 3' de 208 pb del 5° intrón (5'- GGGACCCAAGCGTAAGAAGTCTTATGAAAAAGTTACCTCACAGATTAATAACTAAACATAGGAAAATACCAATGCA CTCCAATGTGTCAATGAGATTAACGCTTGACTAACATGAAAATATAAATATTCACCGAATGAAAGAAAATTAGAAAAC CAGGACCTGTAGATTGTAAGAGATAGATTCTTGAGTTAGAAAACACAAATGATTGTCC -3', SEC ID N° 6) del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa de *Physcomitrella patens* se amplifica a partir de ADN genómico de *Physcomitrella patens*

mediante PCR con corrección de *Pfu* (Promega, Alemania) usando el cebador en dirección 5' Rec2_Sall_SacII (5'-GAG GTC GAC CCG CGG ACC CAA GCG TAA GAA G-3', SEC ID N° 9) y el cebador en dirección 3' Rec2_SmaI (5'-TCT CCC GGG ACA ATC ATTTGT GTT TC-3', SEC ID N° 10). Después de la restricción del producto de la amplificación resultante con *SalI* y *SmaI*, se clona en el vector *pRT99* (Topfer et al. 1988) (digerido con *SalI* y *SmaI*). El plásmido resultante *pRT99Rec2* contiene la segunda secuencia de recombinación de 5'.

Procedimiento de clonación para la primera secuencia de recombinación de 3' en pRT99Rec2

La secuencia de 5' de 250 pb del 5° intrón (5'-GCGGAAATGTTTCAGAGTTAAGCGAAATCACAACTAAAAGAGATTGGAAGCAGAAGAATTTTTGAGCAGCTGTTCT TAATTCACGCAACGACAACGCTATTAACGTGTGTAGACGATGCACTTTCGTAAGGGATCTAAATTTATT ATATCCCTTCATAACTAGAGGCAAGGCGAAATCACAAAATTTGGTACCTACGTACTACAGCCTCCAGGATCA AACATAAGAGTGAAACTGGACC-3', SEC ID N° 3) del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa de *Physcomitrella patens* se amplifica a partir de ADN genómico de *Physcomitrella patens* mediante PCR con corrección de *Pfu* (Promega, Alemania) usando el cebador en dirección 5' Rec22_SmaI (5'-GAG CCC GGG AAA TGT TCA GAG TTA AGC G-3', SEC ID N° 11) y el cebador en dirección 3' Rec22_SacII_SstI (5'-TCT GAG CTC CCG CGG TCC AGT GTT TCA CTCTTATG-3', SEC ID N° 12). Después de la restricción del producto de la amplificación resultante con *SmaI* y *SstI*, se clona en el vector *pRT99Rec2* (digerido con *SmaI* y *SstI*). El plásmido resultante *pRT99Rec22* contiene la segunda secuencia de recombinación de 5' y la primera secuencia de recombinación de 3'.

Construcción de pRT99TPVEGFRec2

El casete de expresión que contiene el promotor de CaMV 35S, TPVEGF₁₂₁ y el terminador de CaMV 35S se corta como un fragmento de *PstI* a partir de *pRT101TPVEGF C3*. Este fragmento se achata mediante la reacción de Klenow y se introduce en el plásmido *pRT99Rec22* digerido con *SmaI* y desfosforilado, dando como resultado el plásmido *pRT99TPVEGFRec2*. La restricción de *pRT99TPVEGFRec1* y *Rec2* con *SacII* o *SalI* y *SstI* da como resultado la linealización de la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico heteróloga que comprende las secuencias de recombinación y las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas de interés que comprenden un promotor operablemente enlazado a ellas. Las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas linealizadas se usan para la transformación de células de musgo.

Condiciones de cultivo estándar

Se hacen crecer axénicamente plantas en condiciones estériles en medio Knop modificado líquido inorgánico completo (1000 mg/l de Ca(NO₃)₂ x 4H₂O, 250 mg/l de KCl, 250 mg/l de KH₂PO₄, 250 mg/l de MgSO₄ x 7 H₂O y 12,5 mg/l de FeSO₄ X 7 H₂O; pH 5,8 (Reski y Abel 1985)). Las plantas se hicieron crecer en matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 200 ml de medio de cultivo, y los matraces se agitan en un agitador Certomat R (B. Braun Biotech International, Alemania) ajustado a 120 rpm. Las condiciones en la cámara de crecimiento son 25 +/- 3°C, y un régimen de luz:oscuridad de 16:8 h. Los matraces se iluminan desde la parte superior mediante dos tubos fluorescentes (Osram L 58 W / 25), que proporcionan 35 μmoles⁻¹m⁻². Los cultivos se subcultivan una vez a la semana vía disgregación usando un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Alemania) e inoculación de dos nuevos matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 100 ml de medio Knop reciente.

Aislamiento de protoplastos

Precultivo de tejido de musgo para el aislamiento óptimo de protoplastos. Los musgos (especialmente *Physcomitrella patens*) se pueden precultivar en diferentes condiciones para obtener rendimientos óptimos de protoplastos:

- I. Rother et al. 1994 cultivaron tejido de musgo durante 7 días en medio Knop con contenido reducido (10%) de Ca(NO₃)₂. Los cultivos se filtraron 3 ó 4 días después de la disgregación, y se transfirieron en medio Knop reciente con contenido reducido (10%) de Ca(NO₃)₂.
- II. En lugar de la reducción de Ca(NO₃)₂, el medio para el precultivo se puede suplementar con 5 mM de tartrato de amonio, o el pH se puede alterar hasta 4,5 (en cultivos líquidos con valores de pH no controlados, se alcanza un pH medio de 5,8 para el medio Knop modificado). Los cultivos se filtran 3 ó 4 días después de la disgregación del tejido, y se transfieren a medio Knop modificado reciente (suplementado con 5 mM de tartrato de amonio, o alterado hasta pH 4,5).
- III. Hohe y Reski (2002) optimizaron las condiciones de cultivo en un biorreactor semicontinuo para obtener rendimientos elevados de protoplastos. Se obtienen protoplastos aislados de rendimientos elevados mediante suplementación de medio Knop modificado (Reski y Abel 1985) con 460 mg/l de tartrato de amonio, o a valores de pH controlados con un punto de ajuste de 4,5 (en cultivos en biorreactores con valores de pH sin

controlarse alcanza un pH medio de 5,8 para medio Knop modificado).

Se han descrito para *Physcomitrella patens* diferentes protocolos para el aislamiento de protoplastos (Grimsley et al. 1977; Schaefer et al. 1991; Rother et al. 1994; Zeidler et al. 1999; Hohe y Reski 2002, Protocol Schaefer 2001) y para la transformación (Schaefer et al. 1991; Reutter y Reski 1996, Protocol Schaefer 2001).

5 Para el trabajo presentado aquí, se usa una modificación/combinación de los métodos previamente descritos:

Tras la filtración, los protonemas de musgo se preincuban en 0,5 M de manitol. Después de 30 minutos, se añade a la suspensión 4% de Driselase (Sigma, Deisenhofen, Alemania). La Driselase se disuelve en 0,5 M de manitol (pH 5,6-5,8), se centrifuga a 3600 rpm durante 10 minutos, y se esteriliza mediante pasada a través de un filtro de 0,22 μm (Millex GP, Millipore Corporation, USA). La suspensión, que contiene 1% de Driselase (concentración final), se incuba en la oscuridad a RT y se agita suavemente (se logran mejores rendimientos de protoplastos después de 2 horas de incubación) (Protocol Schaefer 2001). La suspensión se hace pasar a través de tamices (Wilson, CLF, Alemania) con tamaños de poros de 100 μm y 50 μm . La suspensión se centrifuga en tubos de centrifugadora estériles, y los protoplastos se sedimentan a RT durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro, Alemania) (Protocol Schaefer 2001). Los protoplastos se vuelven a suspender suavemente en medio W5 (125 mM de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 137 mM de NaCl; 5,5 mM de glucosa; 10 mM de KCl; pH 5,6; 660-680 mOsm; filtrado de forma estéril). La suspensión se centrifuga nuevamente a RT durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro, Alemania). Los protoplastos se vuelven a suspender suavemente en medio W5 (Rother et al. 1994). Para el recuento de los protoplastos, se transfiere un pequeño volumen de la suspensión a una cámara de Fuchs-Rosenthal.

Protocolo de transformación

Para la transformación, los protoplastos se incuban en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. Subsiguientemente, los protoplastos se sedimentan mediante centrifugación a RT durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro). Los protoplastos se resuspenden en medio 3M (15 mM de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1% de MES; 0,48 M de manitol; pH 5,6; 540 mOsm; filtrado de forma estéril, Schaefer et al. 1991) a una concentración de $1,2 \times 10^6$ protoplastos/ml (Reutter y Reski 1996). Se dispensan 250 μl de esta suspensión de protoplasto en un nuevo tubo de centrifugadora estéril, se añaden 50 μl de disolución de ADN de ambos constructos, pRT99TPVEGFRecl y pRT99VEGFRec2, y el vector que contiene el marcador de selección (ADN purificada en columna en H_2O (Qiagen, Hilden, Alemania); 10-100 μl ; cantidad de ADN de 30 pg por constructo; 10 pg del vector que contiene el marcador de selección), y finalmente se añaden 250 μl de disolución de PEG (40% de PEG 4000; 0,4 M de manitol; 0,1 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; pH 6 después de someter a autoclave). La suspensión se mezcla inmediatamente pero de manera suave, y después se incuba durante 6 minutos a RT con mezclado suave ocasional. La suspensión se diluye progresivamente añadiendo 1, 2, 3 y 4 ml de medio 3M. La suspensión se centrifuga a 20°C durante 10 minutos a 55 g (aceleración de 3; ralentización a 3; Multifuge 3 S-R, Kendro). El pelete se resuspende en 3 ml de medio de regeneración. El procedimiento de selección se realiza como se describe por Strepp et al. (1998).

Análisis de ADN

El análisis del ADN de plantas transformadas de forma estable se realiza como se describe por Strepp et al. (1998). La estimación del número de copias se realiza mediante análisis de transferencia Southern y mediante comparación con una planta transformada de forma estable que contiene una copia del ADN heterólogo.

Ensayos

Cuantificación de VEGF₁₂₁ recombinante

VEGF₁₂₁ recombinante, expresado mediante plantas de musgo transformadas de forma estable, se cuantifica mediante ELISA (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania). El ELISA se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante. Las muestras se pueden diluir para cuantificación.

Resultados

Para plantas transformadas de forma estable, la estimación de números elevados de copias de constructos integrados se correlaciona con rendimientos elevados de proteína recombinante.

Bibliografía

50 Engel PP (1968) The induction of biochemical and morphological mutants in the moss *Physcomitrella patens*.

Am J Bot 55, 438-446.

Gorr G (1999) Biotechnologische Nutzung von *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. Dissertation, Universität Hamburg.

5

Grimsley NH, Ashton NW y Cove DJ (1977) The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. Mol Gen Genet 154, 97-100.

10

Hohe A, Reski R (2002) Optimisation of a bioreactor culture of the moss *Physcomitrella patens* for mass production of protoplasts. Plant Sci 163, 69-74.

Reski R, Abel WO (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. Planta 165, 354-358.

15

Reski R, Faust M, Wang X-H, Wehe M, Abel WO (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. Mol Gen Genet 244, 352-359.

Rother S, Hadelers B, Orsini JM, Abel WO y Reski R (1994) Fate of a mutant macrochloroplast in somatic hybrids. J Plant Physiol 143, 72-77.

20

Reutter K y Reski R (1996) Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2, 142-147.

25

Schaefer D, Zryd J-P, Knight CD y Cove DJ (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. Mol Gen Genet 226, 418-424.

Schaefer DG (2001) Principles and protocols for the moss *Physcomitrella patens*. <http://www.unil.ch/lpc/docs/PPprotocols2001.pdf>

30

Strepp R, Scholz, S, Kruse, S, Speth V y Reski, R (1998) Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homologue of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4368-4373.

35

Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J y Steinbiss H-H (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. NAR 15, 5890.

Topfer, R, Schell, J y Steinbiss,H-H (1988) Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. NAR 16, 8725.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> greenovation Biotech GmbH

<120> Método de producción de proteínas

5 <130> 1061

<140> 03017343.9

<141> 31/07/2003

10 <160> 12

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador MoB323

<400> 1

atactcgagg aagatgaact ttctgcctg tcttgg

36

25

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador MoB349

<400> 2

35

ctgccatggg tgcagcctgg gaccac

26

<210> 3

<211> 250

5 <212> ADN

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> intrón

10 <222> (1)..(250)

<223> secuencia de 5' del 5º intrón del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa

<400> 3

15 gcggaatgt tcagagtaa gcgaaatcac aactaaaaga gattggaagc agaagaattt 60
 ttgagcagct gttcttaatt cacgcaacga caacgctatt aactgtatgt gtagacgatg 120
 cactttcgta ctgaagggat ctaaatttat tatatccctt cataactaga ggcaaggcgg 180
 aaatcacaaa actattggta cctacgtact acagcctcca ggatcaaaca taagagtgaa 240
 acactggacc 250

<210> 4

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 5' Rec1_Sall_SacII

25 <400> 4

gaggtgacc cgcggaatg ttcagag

27

<210> 5

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 3' Rec1_Smal

<400> 5

5 ctccccgggt ccagtgtttc actc 24

<210> 6

<211> 208

<212> ADN

10 <213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> intrón

<222> (1)..(208)

15 <223> secuencia de 3' del gen de alfa 1,3-fucosiltransferasa

<400> 6

```

gggacccaag cgtaagaagt cttatgaaaa agttacctca cagattaaaa ctaaacaatag 60
gaaaatacca atgcactcca atgtgtcaat gagattaacg cttgactaac atgaaaatat 120
aaatattcac cgaatgaaag aaattagaaa acaggacctg tagattgtaa gagatagatt 180
cttgagttag aaacacaaat gattgtcc 208
    
```

20

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 5' Rec11_Smal

<400> 7

30

gagcccggga cccaagcgta agaag 25

<210> 8

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 3' Rec11_sacll_SsTII

<400> 8

tctgagctcc cgcgacaat cattgtgtt tc 32

10

<210> 9

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 5' Rec2_Sall_Sacll

<400> 9

20

gaggtcgacc cgcgaccca agcgtaagaa g 31

<210> 10

<211> 26

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 3' Rec2_Smal

30

<400> 10

tctccggga caatcatttg tgttc 26

35

<210> 11

ES 2 359 245 T3

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 5' Rec22_Smal

<400> 11

10 gagcccggga aatgttcaga gttaagcg 28

<210> 12

<211> 35

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador en dirección 3' Rec22_SaclI_SstI

20 <400> 12

tctgagctcc cgcggtccag tgttcactc ttatg 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar la expresión génica en una célula de planta de musgo, que comprende
 - 5 1) proporcionar al menos un primer constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por una primera secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por una segunda secuencia de recombinación en la misma orientación que la primera;
 - 10 2) proporcionar al menos un segundo constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por dicha segunda secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por dicha primera secuencia de recombinación en la misma orientación que la segunda; y
 - 3) transformar en la célula de la planta de musgo al menos dicho primer y dicho segundo constructo de ácido nucleico heterólogo.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el dicho al menos primer constructo y el dicho al menos segundo constructo se cotransforman en un protoplasto de musgo.
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dicho primer constructo y el dicho segundo constructo está comprendido por al menos un conjunto de secuencias de recombinación complementarias.
- 20 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las secuencias de recombinación derivan o se seleccionan de ADN genómico, ADNc, intrón, una región no codificante o un exón o cualquier combinación de los mismos.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que la secuencia de recombinación se selecciona de un intrón o una región no codificante.
- 25 6. Un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la longitud de las secuencias de recombinación es de 25 a 1000 nucleótidos de longitud.
7. Un método según la reivindicación 6, en el que la longitud de las secuencias de recombinación es de 50-650 nucleótidos de longitud.
8. Un método según la reivindicación 7, en el que la longitud de las secuencias de recombinación es de 100-400 nucleótidos de longitud.
- 30 9. Un conjunto de vectores de ácido nucleico adecuado para amplificar la expresión génica en una célula de planta de musgo, en el que dicho conjunto de vectores de ácido nucleico comprende i) al menos un primer constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por una primera secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por una segunda secuencia de recombinación en la misma orientación que la primera; y ii) al menos un segundo constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga operablemente enlazada a un promotor, en el que el dicho constructo está flanqueado en el extremo 5' del mismo por dicha segunda secuencia de recombinación, y está flanqueado en el extremo 3' del dicho constructo por dicha primera secuencia de recombinación en la misma orientación que la segunda.
- 35 10. Un conjunto de vectores de ácido nucleico según la reivindicación 9, en el que los constructos son constructos de ADN lineales.
11. Una célula de musgo transformada con un conjunto de vectores de ácido nucleico como se define en la reivindicación 9 ó 10.
- 45 12. Una célula de musgo según la reivindicación 11, que es un protoplasto de musgo o una célula de protonema de musgo.
13. Una célula de musgo según la reivindicación 12, que deriva de *Physcomitrella patens*.
14. Tejido de protonema de musgo comprendido por células transformadas con un conjunto de vectores de ácido nucleico como se define en la reivindicación 9 ó 10.
15. Uso de células de protonema de musgo transformadas con un conjunto de vectores de ácido nucleico como se

define en la reivindicación 9 ó 10, en la producción de proteína a partir de ellas.

16. Uso según la reivindicación 15 de células de protonema de musgo derivadas o seleccionadas de *Physcomitrella patens* que son transformadas con un conjunto de vectores de ácido nucleico como se define en la reivindicación 9 ó 10.