



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 359 689**

② Número de solicitud: 200900314

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **30.01.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.05.2011

⑦ Solicitante/s: **Universitat de València**
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia, ES

⑦ Inventor/es: **Gavidia Sánchez, Isabel y**
Pérez-Bermúdez Inglés, Pedro

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Uso del gen *P5βR2* para incrementar la síntesis de cardenólicos.**

⑤ Resumen:

Uso del gen *P5βR2* para incrementar la síntesis de cardenólicos.

En la presente invención se describe un nuevo gen que codifica para una proteína miembro de la familia de proteínas SDR con actividad progesterona 5β-reductasa y específico de las especies vegetales capaces de sintetizar cardenólicos. Dicho gen, *P5βR2*, presenta una secuencia promotora capaz de incrementar la expresión del mismo en condiciones de estrés biótico, abiótico y como respuesta a diferentes elicitores químicos. El incremento en la expresión génica de *P5βR2* se traduce en un incremento en la síntesis de cardenólicos totales por parte de las plantas que presentan dicho gen.

ES 2 359 689 A1

DESCRIPCIÓN

Uso del gen *P5βR2* para incrementar la síntesis de cardenólidos.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al uso del gen *P5βR2* y de la proteína que codifica, para incrementar la síntesis de cardenólidos en respuesta a situaciones de estrés biótico y abiótico. Por lo tanto, la presente invención puede englobarse dentro del campo de la biología vegetal e ingeniería genética. Al ser los cardenólidos utilizados en el campo farmacéutico, la presente invención también se adscribe a este sector.

Estado de la técnica

Los cardenólidos son productos naturales obtenidos de diferentes especies del género *Digitalis* (Plantaginaceae). Se encuentran principalmente en forma de glicósidos. Las especies vegetales productoras de cardenólidos utilizan dichos compuestos principalmente como mecanismo de defensa frente al ataque de sus depredadores, al tratarse de sustancias tóxicas para los mismos. Así, incrementan su síntesis, principalmente en las hojas, para evitar ser devoradas por los herbívoros (Harborne J.B., 1982; Malcolm S.B. *et al.* 1996). En este sentido, los cardenólidos representan un interesante caso de interacción entre las plantas y el ambiente que las rodea.

Actualmente, los cardenólidos se emplean en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y, al igual que otros productos de interés medicinal, sólo pueden ser obtenidos directamente de las plantas. Por este motivo, el estudio de los genes y enzimas implicadas en su biosíntesis son la base para el desarrollo de estrategias alternativas para su producción. En este sentido, el colesterol y diferentes fitoesteroides han sido propuestos como punto de partida para la biosíntesis de los cardenólidos, ya que la ruta bioquímica en la que participan estos productos y que da lugar a la formación de progesterona, es similar a la ruta biosintética que transforma el colesterol en hormonas esteroídicas en animales. Sin embargo, la reacción de reducción de la progesterona es un punto de intersección divergente en las rutas metabólicas de plantas y animales. La progesterona es metabolizada por reductasas estereoespecíficas de doble enlace que dan lugar a los derivados del tipo 5α o 5β . Estas reductasas son la 5α -reductasa y la 5β -reductasa. La enzima 5α -reductasa se halla estructural y funcionalmente conservada en animales y plantas. En cambio, plantas y animales han reclutado distintos genes para la codificación de las enzimas 5β -reductasas. Uno de estos genes es el *P5βR*, el cual es específico del reino vegetal, estando ausente en animales (Gavidia *et al.* 2007).

Gavidia *et al.* (2007) aislaron y secuenciaron un cDNA que codifica para una proteína responsable de la actividad progesterona 5β -reductasa. Mediante análisis comparativos de secuencias, demostraron que dicha enzima, *P5βR*, pertenece a la superfamilia de las proteínas deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR). Los motivos activos de dicha familia de proteínas se encuentran altamente conservados entre plantas y bacterias, pero mostraron que la secuencia de *P5βR* presenta unos motivos específicos y diferentes de los de la familia de proteínas SDR descritas hasta ahora. Se propuso que la proteína *P5βR* tiene un mecanismo de acción nuevo y diferente y, que además, dichas secuencias motivo definían una nueva familia de proteínas SDRs.

P5βR es una enzima presente en especies vegetales productoras de cardenólidos, así como en otras que no son capaces de sintetizarlos. Este hecho sugiere que dicha proteína debe tener otras funciones fisiológicas, aparte de la descrita como productora de cardenólidos, pudiendo existir otras enzimas más fuertemente implicadas en dicha producción y que se expresen únicamente en especies productoras de cardenólidos.

Así, en la presente invención se describe la secuencia de un nuevo gen llamado *P5βR2*, específico de plantas productoras de cardenólidos y cuya expresión se ve incrementada en situaciones de respuesta a estrés biótico y/o abiótico, tales como: cambios bruscos de temperatura, exceso de sales en el medio, daños de tipo mecánico y elicitores químicos. Este gen codifica para una proteína con actividad progesterona 5β -reductasa y como consecuencia de ese incremento en su expresión, se produce un incremento en la síntesis de cardenólidos. Este nuevo gen pertenece a la familia de proteínas SDR, al igual que el gen *P5βR* y ambos codifican para proteínas con actividad progesterona 5β -reductasa. Ambos genes presentan diferencias tanto en sus secuencias nucleotídicas (63% de homología) como en las aminoácidas (54% de homología). Además, el gen de la presente invención no está presente en todo el reino vegetal, sino que está limitado a determinadas especies vegetales implicadas en la síntesis de cardenólidos, como por ejemplo plantas del género *Digitalis* (*D. purpurea*, *D. minor*, *D. obscura*, *D. parviflora*, *D. dubia*, *D. lutea*, *D. lanata*, etc.) e *Isoplexis* (*I. sceptrum*, *I. chalcantha*, *I. canariensis*, *I. isabelliana*), y de otras especies filogenéticamente relacionadas (*Veronica polita* y *Plantago major*) no productoras de cardenólidos.

La variación en la concentración de cardenólidos en especies de plantas de dichos géneros se ve afectada por condiciones de estrés biótico y/o abiótico, así como por tratamientos con agentes químicos. En este sentido, las heridas, los insectos, el CO₂, la falta o el exceso de agua, el fotoperiodo y el termoperiodo, el ácido abscísico, el etileno, el H₂O₂ y la sulfoximinabutionina (BSO) como inhibidor de la biosíntesis de glutatión, alteran la síntesis de cardenólidos, normalmente incrementando su producción. En la presente invención se demuestra que el incremento en la expresión del gen *P5βR2* tiene como consecuencia un incremento en la síntesis de cardenólidos. Por este motivo se piensa que el gen de la presente invención, *P5βR2*, tiene una implicación directa en la síntesis de cardenólidos, al contrario del gen *P5βR*, que tendría otras funciones fisiológicas diferentes de las derivadas de la síntesis de cardenólidos, al expresarse ubicuamente en todo el reino vegetal, no como *P5βR2* que es exclusivo de especies productoras de cardenólidos y de

algunas relacionadas filogenéticamente. En este sentido, la presente invención demuestra que diferentes condiciones de estrés y determinadas sustancias químicas como las arriba mencionadas, son capaces de inducir un incremento en la expresión génica de *P5βR2* y como consecuencia se produce un incremento en la síntesis de cardenólidos. Por el contrario, esos mismos factores, no inducen un aumento ni modifican la expresión génica basal del gen *P5βR*.

En el metabolismo secundario, existen muchos casos de familias multigénicas que codifican diferentes proteínas con similares propiedades bioquímicas y que se diferencian exclusivamente en su inducción y/o distribución, en un tejido o en un órgano específico. En el caso de la presente invención se demuestra que la enzima *P5βR2* presenta similar función, actividad progesterona 5β-reductasa, que la enzima *P5βR*, pero la expresión de su gen es inducible en diferentes condiciones, como por ejemplo, temperaturas altas y bajas, alta concentración de sales en el suelo, daños de tipo mecánico, tratamiento con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y agua oxigenada (H₂O₂), mientras que la expresión del gen *P5βR* no se ve modificada.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

Los cardenólidos son productos naturales que se encuentran principalmente en forma de glicósidos y son obtenidos de diferentes especies del género *Digitalis* (Plantaginaceae). Estos compuestos son una droga inotrópica preferentemente de administración oral y muy segura en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

La presente invención describe el uso de un nuevo gen llamado *P5βR2* para producir un incremento en la síntesis de cardenólidos en plantas capaces de sintetizarlos, como respuesta a diferentes tratamientos con elicitores o a condiciones de estrés. *P5βR2* codifica una proteína perteneciente a la superfamilia de proteínas SDR, con actividad progesterona 5β-reductasa. La secuencia de *P5βR2* presenta una homología del 63% respecto a la secuencia del gen de su misma familia, *P5βR*. En las condiciones de estrés antes mencionadas, *P5βR2* incrementa su expresión, mientras que *P5βR* no produce ningún cambio en la misma. Por otro lado, la proteína sintetizada por *P5βR2* presenta idéntica función, progesterona 5β-reductasa, que la sintetizada por *P5βR*, pero poseen una secuencia aminoacídica diferente, presentando únicamente un 54% de homología.

El incremento en la expresión génica de *P5βR2* como respuesta a las condiciones de estrés antes mencionadas tiene como consecuencia el incremento en la síntesis de cardenólidos en las plantas productoras de los mismos.

Otra de las características que definen al gen *P5βR2* de la presente invención es que se trata de un gen exclusivo del reino vegetal, pero además está limitado a determinadas especies de plantas, que son aquellas capaces de sintetizar cardenólidos, como es el caso de plantas del género *Digitalis* e *Isoplexis*. Por este motivo, *P5βR2* tiene una implicación directa en la síntesis de cardenólidos, mientras que al gen *P5βR*, que se expresa en todo el reino vegetal, se le ha implicado en otras funciones fisiológicas del desarrollo vegetal diferentes de las derivadas de la síntesis de cardenólidos.

A efectos de la presente invención, se hacen constar los siguientes términos:

- Promotor: secuencia específica de ADN localizado justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del ARN y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que codifica.
- Estrés: se define como todo factor externo que ejerce una influencia sobre la planta y genera una respuesta por parte de la misma. A efectos de la presente invención los factores que producen estrés en la planta se seleccionan entre: bióticos (causados por la acción de seres vivos, como animales, otras plantas y agentes patógenos) y abióticos (temperatura, humedad, heridas y elicitores químicos).
- Elicitor químico: cualquier sustancia, endógena o exógena, que induce una respuesta en la planta, que puede constituir un mecanismo de defensa. Este término se utiliza principalmente en biología vegetal.
- Altas temperaturas: a efectos de la presente invención se define el término de “alta temperatura” cuando ésta es superior o igual a 40°C.
- Bajas temperaturas: a efectos de la presente invención se define el término de “baja temperatura” cuando ésta es inferior o igual a 4°C.
- Alta concentración de sales en el medio: a efectos de la presente invención se define el término de “alta concentración de sales en el medio” cuando el agua de riego de las plantas contiene una concentración mayor o igual a 250 mM de NaCl.

Descripción de las figuras

Figura 1. Expresión génica de *P5βR* y *P5βR2* en plantas *Digitalis purpurea*. A). Análisis de la expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) mediante RT-PCR en flores (F), hojas (H), tallo (T), haces vasculares (V) y raíces (R) de *D. purpurea*. Como control interno de carga se ha usado el gen de actina (3). B). Análisis de la expresión génica de *P5βR*

ES 2 359 689 A1

(1) y *P5βR2* (2) en hojas de *D. purpurea* mediante Real Time-qPCR. Los resultados están expresados como porcentaje de expresión relativa frente a *P5βR*.

Figura 2. Análisis de la expresión génica de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de *D. purpurea* sometidas a temperaturas altas, bajas y alta concentración de sales en el medio. A). Análisis de la expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) en hojas de *D. purpurea* sometidas a 40°C durante 1, 2 y 4 horas respecto a la expresión de dichos genes en hojas control (C) de *D. purpurea* no sometidas a altas temperaturas. B). Análisis de la expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) en hojas de *D. purpurea* sometidas a 4°C durante 2 y 4 horas respecto a la expresión de dichos genes en hojas control (C) de *D. purpurea* no sometidas a bajas temperaturas. C). Análisis de la expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) en hojas de *D. purpurea* sometidas a un exceso de sales en el medio (250 mM de NaCl) durante 6, 24 y 48 horas respecto a la expresión de dichos genes en hojas control (C) de *D. purpurea* no sometidas a altas concentraciones salinas en el medio. La figura muestra fotografías representativas de los geles obtenidos mediante la técnica de RT-PCR en muestras de hojas de *D. purpurea*. Como control interno de carga se ha utilizado el gen de la actina (3).

Figura 3. Expresión génica de *P5βR* y *P5βR2* a lo largo del tiempo en hojas de plantas *D. purpurea* después de producirles un daño de tipo mecánico. A). Expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) después de 1, 2, 3, 6 y 15 horas de haber producido daño en las hojas de *D. purpurea*, respecto a la expresión de dichos genes en las hojas de plantas de *D. purpurea* que no han sufrido daño, plantas control (C). Los resultados han sido obtenidos mediante análisis de RT-PCR. B). Expresión génica de *P5βR* (1) y *P5βR2* (2) después de 6, 8, 24, 48 y 72 horas de haber producido daño mecánico en las hojas de planta de *D. purpurea*, respecto a la expresión de dichos genes en las hojas de plantas de *D. purpurea* que no han sufrido daño, plantas control (C). La gráfica muestra los niveles de expresión relativa de ambos genes respecto a las plantas control. Los resultados se han obtenido mediante análisis de Real Time-qPCR. Como control interno se ha utilizado el gen de la actina. Las barras blancas representan el nivel de expresión del gen *P5βR* y las grises el nivel de expresión del gen *P5βR2*.

Figura 4. Efecto producido por el tratamiento con diferentes elicitores químicos en los niveles de expresión génica de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de plantas *D. purpurea* a lo largo del tiempo. Las gráficas muestran los niveles de expresión relativa de ambos genes después del tratamiento con los diferentes elicitores químicos, respecto a los obtenidos en las muestras de plantas control (C) no sometidas a dichos tratamientos. Los resultados se han obtenido mediante análisis de Real Time-qPCR, en la gráfica se muestra los valores de la media±ES de 3 experimentos independientes. Como control interno se ha utilizado el gen de la actina. Las barras blancas representan el nivel de expresión del gen *P5βR* y las grises el nivel de expresión del gen *P5βR2*. A) Niveles de expresión de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de *D. purpurea* después de 4, 8, 24 y 48 horas de haber sido tratadas con ácido salicílico, respecto a los niveles de expresión de los mismos genes en hojas de plantas control, no tratadas. B) Niveles de expresión de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de *D. purpurea* después de 4, 8, 24 y 48 horas de haber sido tratadas con ácido jasmónico respecto a los niveles de expresión de los mismos genes en hojas de plantas control, no tratadas. C) Niveles de expresión de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de *D. purpurea* después de 4, 8, 24 y 48 horas de haber sido tratadas con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor de etileno, respecto a los niveles de expresión de los mismos genes en hojas de plantas control, no tratadas. D) Niveles de expresión de *P5βR* y *P5βR2* en hojas de *D. purpurea* después de 4, 8, 24 y 48 horas de haber sido tratadas con H₂O₂, respecto a los niveles de expresión de los mismos genes en hojas de plantas control, no tratadas.

Figura 5. Análisis de la concentración de cardenólidos totales (mg/g peso seco) a lo largo del tiempo después de someter a la planta a un daño de tipo mecánico. Cada valor representa la variación de los cardenólidos totales respecto a su propio control (sin daño mecánico y a tiempo 0). Los valores se representan como la media±ES de cuatro experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe el uso del gen *P5βR2* para la transformación de plantas que presentan un incremento en la síntesis de cardenólidos como mecanismo de defensa frente a situaciones de estrés (biótico, abiótico y en respuesta a elicitores químicos). El gen *P5βR2* codifica para una proteína miembro de la familia de proteínas SDR con actividad progesterona 5β-reductasa y específico de las especies vegetales capaces de sintetizar cardenólidos.

Clonaje y Análisis de la Secuencia de *P5βR2*

Para el clonaje del gen *P5βR2* se utilizó como sonda un fragmento genómico del gen *P5βR* (SEQ ID NO:1) y mediante una selección en una librería de cDNAs de hojas de *D. purpurea* se aisló un clon diferente de *P5βR*. Mediante procedimientos de biología molecular (explicados con detalle a continuación en los siguientes ejemplos de la presente invención) se aisló el cDNA completo de dicho clon que tenía una longitud de 1332 pb. El gen completo, SEQ ID NO:4, comprende una secuencia promotora de aproximadamente 2007 pb y una parte codificante (región ORF) de 1185 pb más un intrón de 86 pb localizado a 57 pb del codón de iniciación ATG. El gen *P5βR2* codifica para un polipéptido de 394 aminoácidos (SEQ ID NO:5) con un peso molecular aproximado de 44,2 kDa, y con un punto isoelectrico de 5.1.

Análisis comparativos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *P5βR* (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:6, respectivamente) y de *P5βR2* (SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, respectivamente) de plantas *D. purpurea* mostraron unos porcentajes de homología del 63% y 54% respectivamente. Además, se averiguó que la secuencia génica de *P5βR2* no presenta homología con otras proteínas, excepto con *P5βR*. A diferencia de la ubicuidad de *P5βR*, que

ES 2 359 689 A1

se encuentra altamente conservado a lo largo del reino vegetal (Gavidia *et al* 2007), la presencia de *P5βR2* está limitada a algunas especies de plantas productoras de cardenólidos, en las que se incluyen los géneros *Digitalis* e *Isoplexis*.

5 *Obtención y purificación de la proteína recombinante codificada por P5βR2*

Para la obtención de la proteína recombinante codificada por el gen *P5βR2*, se utilizaron métodos convencionales de PCR. El fragmento de ADN obtenido mediante la técnica de PCR, se clonó en el vector pMAL-c2x (New England Biolabs), el cual fue introducido en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, CECT 7463 con fecha de depósito 6.11.08.

10

Tras el cultivo de las bacterias, la purificación de la proteína recombinante tuvo lugar mediante la técnica de cromatografía de afinidad, como se describe en Gavidia *et al.*, 2007. La proteína recombinante obtenida fue una proteína soluble y catalíticamente activa, con una masa molecular estimada de 87 kDa. Esta masa molecular corresponde al peso de la proteína recombinante *P5βR2* unida a la proteína de unión a maltosa (MBP) que lleva el vector pMAL-c2x.

15

Análisis de la actividad de la proteína recombinante P5βR2

Purificada la proteína *P5βR2* recombinante, se procedió a su concentración mediante los concentradores Vivaspín (Vivascience). Mediante análisis de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS), se demostró que la proteína purificada muestra actividad progesterona 5-β-reductasa y es capaz de catalizar la reacción de reducción de progesterona a 5β-pregnano-3,20-diona. Además, al igual que *P5βR*, la forma recombinante de *P5βR2* puede catalizar la reducción de diferentes esteroides con estructura tipo 3-oxoΔ^{4,5}, aunque la mayor especificidad de sustrato se obtuvo con la progesterona. Otra de las características observadas de la proteína *P5βR2*, es que para ejercer su actividad progesterona 5β-reductasa requiere de la presencia de la molécula NADPH, como cofactor, además la reacción catalizada por dicha enzima es irreversible.

25

Patrón de expresión del gen P5βR2 en D. purpurea

Para analizar el patrón de expresión del gen *P5βR2* respecto al de *P5βR*, se utilizaron muestras de diferentes partes de plantas *D. purpurea* (flores, hojas, tallo, haces vasculares de la parte basal de las hojas y raíces). Los resultados mostraron que los transcritos de *P5βR2* estaban presentes en todas las zonas de las plantas estudiadas, siendo mayoritaria su expresión en las flores y en las hojas (Figura 1).

30

También se analizó el nivel de expresión de ambos genes, *P5βR2* y *P5βR*, en condiciones ambientales normales para el crecimiento de las plantas, observando que la expresión de *P5βR2* representaba el 1.5% respecto de la expresión de *P5βR*, por lo que dicho gen apenas presenta expresión en condiciones ambientales normales.

35

Expresión inducible del gen P5βR2

La presencia de dos genes diferentes, *P5βR* y *P5βR2*, que transcriben dos proteínas con idéntica actividad, progesterona 5β reductasa, implicadas en la síntesis de cardenólidos en plantas, hizo pensar que, como ocurre en otras familias multigénicas que codifican diferentes proteínas con similares propiedades bioquímicas y que se diferencian exclusivamente en su inducción y/o distribución, en un tejido u órgano específico, si la expresión de dichos genes podría modificarse en respuesta a condiciones ambientales adversas, tales como temperaturas altas o bajas, exceso de sales en el medio, daños mecánicos, heridas, cortes, etc., ya que como se ha mencionado anteriormente los cardenólidos son sustancias utilizadas por las plantas como mecanismo de defensa frente a por ejemplo, sus depredadores. Así la existencia de los dos genes con actividad progesterona 5β-reductasa implicada en la síntesis de dichas moléculas, podría ser un ejemplo más de genes inducibles en determinadas condiciones.

45

Para demostrar este hecho se analizó la expresión de los genes *P5βR2* y *P5βR* en muestras de hojas de plantas *D. purpurea* después de someterlas a diferentes condiciones de estrés, como puede ser: temperaturas altas (40°C), bajas (4°C), exceso de sales en el medio (250 mM de NaCl), daños mecánicos como cortes o heridas y tratamientos con diferentes elicitores (etileno y H₂O₂) y se comparó dicha expresión con la producida en muestras de hojas de plantas control que no habían sido sometidas a ningún tipo de estrés.

50

Como se observa en las Figuras 2, 3 y 4 los niveles de expresión del gen *P5βR2* son muy bajos comparados con los del gen *P5βR*, en las muestras de hojas de *D. purpurea* en condiciones normales, no sometidas a ningún tipo de estrés. En cambio, cuando las plantas fueron sometidas a los diferentes tipos de estrés antes mencionados, se produjo un incremento en la expresión génica de *P5βR2*, mientras que la expresión de *P5βR* no se ve modificada. Estos resultados ponen de manifiesto que el gen *P5βR2* es un gen inducible, incrementando su expresión en condiciones de estrés de tipo biótico, abiótico y después del tratamiento con diferentes elicitores químicos.

60

Análisis de la concentración de cardenólidos

Para demostrar si el incremento en la expresión génica de *P5βR2* observado después de producir un daño mecánico en la planta se traduce en un incremento en la síntesis de cardenólidos en las mismas se procedió al estudio de la concentración de dichas sustancias en muestras de hojas de plantas *D. purpurea* después de producirles un daño mecánico. En la figura 5 se observa que se produce un incremento en la síntesis de cardenólidos totales a las pocas

65

ES 2 359 689 A1

horas de producirse el daño mecánico (4 horas), disminuyendo posteriormente dicha concentración, aunque se produce un incremento paulatino y mantenido a lo largo del tiempo (días).

5 Así, el primer objeto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica aislada de plantas representada por SEQ ID NO:4 que codifica para una proteína, representada por SEQ ID NO:5, con actividad progesterona 5 β -reductasa, capaz de incrementar la síntesis de cardenólidos en plantas como respuesta a condiciones de estrés de tipo biótico, abiótico y/o tratamiento con elicitores químicos.

10 En una realización preferida, la secuencia nucleotídica de la invención se caracteriza porque se selecciona entre los géneros *Digitalis* preferentemente *D. purpurea*, *D. grandiflora*, *D. davisiana*, *D. ferruginea*, *D. ciliata*, *D. viridiflora*, *D. laevigata*, *D. minor*, *D. obscura*, *D. parviflora*, *D. dubia*, *D. lutea*, *D. lanata*, e *Isoplexis*, preferentemente, *I. sceptrum*, *I. chalcantha*, *I. canariensis*, *I. isabelliana*, y otras especies filogenéticamente relacionadas, *Veronica polita* y *Plantago major*.

15 En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica de la invención se caracteriza porque las condiciones de estrés abiótico se seleccionan entre: altas temperaturas, preferentemente por encima de 40°C, bajas temperaturas, preferentemente por debajo de 4°C; alta salinidad en el medio, preferentemente por encima de 250 mM de NaCl.

20 En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica de la invención se caracteriza porque las condiciones de estrés biótico son de tipo mecánico, preferentemente en forma de heridas en la planta.

En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica de la invención se caracteriza porque los elicitores químicos se seleccionan entre etileno y especies reactivas de oxígeno, preferentemente H₂O₂.

25 El segundo objeto de la presente invención se refiere al vector de expresión que comprende y expresa la secuencia nucleotídica representada por SEQ ID NO:4.

El tercer objeto de la presente invención se refiere a las células no humanas transformadas con el vector de expresión definido anteriormente.

30 En una realización preferida, las células no humanas transformadas de la presente invención se caracterizan por ser de la cepa de *E. coli* CECT 7463.

35 El cuarto objeto de la presente invención se refiere al uso de las células no humanas transformadas descritas anteriormente para la producción de proteína recombinante con actividad progesterona 5 β -reductasa.

En una realización preferida, el uso de las células no humanas transformadas de la presente invención se caracteriza porque la proteína recombinante obtenida está representada por SEQ ID NO:5.

40 El quinto objeto de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica definida anteriormente para la producción de proteína recombinante con actividad progesterona 5 β -reductasa, caracterizado porque la proteína recombinante obtenida está representada por SEQ ID NO:5.

45 En una realización preferida, el uso de la secuencia nucleotídica de la invención se utiliza preferentemente para la síntesis de cardenólidos.

Depósito de microorganismos de acuerdo con el tratado de Budapest

50 Los microorganismos utilizados en la presente invención fueron depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sita en el Edificio de Investigación de la Universidad de Valencia, Campus Burjassot, Burjassot 46100 (Valencia, España).

- Cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pMAL-c2x, depositada en la fecha 6.11.2008 con nº de depósito CECT 7463.

55 Se describen a continuación ejemplos en los que se muestra detalladamente el procedimiento para incrementar la síntesis de cardenólidos en plantas *D. purpurea* incrementando la expresión del gen *P5 β R2* como respuesta a situaciones de estrés biótico y abiótico, así como a diferentes tratamientos con elicitores químicos.

60 Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el objetivo de ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

65 *Clonaje y Análisis de la Secuencia de P5 β R2 en plantas D. purpurea*

Para el clonaje del gen *P5 β R2* se utilizó como sonda un fragmento genómico de 850 pb del gen *P5 β R* (SEQ ID NO:1). Con este fragmento se realizó una selección en condiciones de estringencia moderada en una librería de

ES 2 359 689 A1

cDNAs de plantas *D. purpurea*. Este análisis dio como resultado el aislamiento de varios clones positivos y diferentes de *P5βR*, que se clonaron en el vector pBluescripSK(-)phagemid, para posteriormente ser secuenciados. Uno de los clones de cDNA contena un fragmento aproximado de 900 pb. Para el aislamiento del cDNA completo de dicho clon se utilizó la librería de cDNA de *D. purpurea* y mediante RT-PCR usando como molde un cebador 5' no específico de dicho clon (Cebador T3) (SEQ ID NO:2) y un cebador específico de la región 3' (SEQ ID NO: 3) complementario al fragmento de cDNA de interés. El clon resultante, llamado *P5βR2* (SEQ ID NO:4) tenía una longitud de 3278 pb y contenía una región ORF de 1186 pb. El análisis de la secuencia *P5βR2* puso de manifiesto que es un clon de cDNA completo (incluye el codón de iniciación ATG y un codon stop). El gen completo comprende una secuencia promotora de aproximadamente 2007 pb y una parte codificante (región ORF) de 1186 pb más un intrón de 86 pb localizado a 57 pb del codón de iniciación ATG.

El gen *P5βR2* codifica para un polipéptido de 394 aminoácidos (SEQ ID NO:5) con un peso molecular aproximado de 44,2 kDa y con un punto isoeléctrico de 5.1. El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *P5βR* (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:6, respectivamente) y de *P5βR2* (SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, respectivamente) de plantas *D. purpurea* mostraron que presentan una identidad del 63% y 54%, respectivamente.

Para averiguar si el péptido presentaba homología con otras proteínas que no se correspondiesen con *P5βR*, se realizó una búsqueda en bases de datos, demostrando que no existía homología significativa con otras proteínas, excepto con *P5βR*. La presencia del gen *P5βR2*, a diferencia de *P5βR*, se encuentra limitada a determinadas especies del reino vegetal, que incluye los géneros *Digitalis* e *Isoplexis*, mientras que el gen *P5βR* está presente a lo largo de todo el reino vegetal (Gavidía *et al.*, 2007).

Ejemplo 2

Obtención y purificación de la proteína recombinante codificada por P5βR2 en plantas D. purpurea

Conocida la secuencia de *P5βR2* en plantas *D. purpurea*, se crearon dos cebadores específicos (SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8), correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen. Haciendo uso de estos cebadores se amplificó por métodos convencionales de PCR un fragmento de 1185 pb (región ORF del gen *P5βR2*). Tal fragmento se clonó en el vector pMAL-c2x (New England Biolabs) y se expresó como una proteína de fusión junto con la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo N-terminal. El vector se introdujo en *E. coli* BL21(DE3)pLysS, CECT 7463 con fecha de depósito 6.11.08.

La expresión de *P5βR2* tuvo lugar mediante la adición de 0.3 mM de isopropilo-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) en medio de cultivo celular LB suplementado con glucosa (2 g/L) y ampicilina (100 mg/l) a 15°C. Tras 4 horas de cultivo, las bacterias fueron recogidas, sonicadas y centrifugadas. El sobrenadante obtenido contiene la proteína *P5βR2* recombinante unida a maltosa en su extremo N-terminal. La purificación de la proteína recombinante tuvo lugar mediante la técnica de cromatografía de afinidad usando resina de amilosa, como se describe en Gavidía *et al.*, 2007. Después de la purificación, la proteína recombinante obtenida fue una proteína soluble y catalíticamente activa, con una masa molecular estimada de 87 kDa (masa molecular correspondiente a la proteína *P5βR2* unida a MBP).

Ejemplo 3

Análisis de la actividad y de las propiedades bioquímicas de la proteína P5βR2 recombinante obtenida

Una vez purificada la proteína *P5βR2* recombinante obtenida, se concentró la misma sustituyendo el buffer de elución por el de reacción (50 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 250 mM de sacarosa, 2 mM de EDTA y 1 mM de DTT) y utilizando los concentradores comerciales Vivaspin (Vivascience). La concentración de proteína recombinante obtenida fue cuantificada mediante el método de Bradford (1976).

Para analizar si la proteína obtenida presentaba la misma actividad, progesterona 5β-reductasa que *P5βR*, se utilizó el protocolo descrito por Gärtner *et al.* (1994). La mezcla de reacción estándar consistió en 6.4 mM de NADP+, 32.1 mM de glucosa-6-fosfato, 42nkat glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 270 μM de progesterona y 100 μg de la proteína *P5βR2* recombinante, llegando a un volumen final de 750 μl en la mezcla de reacción. Los ensayos se incubaron durante 3 h a 30°C y la reacción se paró cuando se añadió CH₂CL₂ a la mezcla de reacción. La extracción y purificación de los metabolitos obtenidos, pregnanos, en dicha reacción se llevó a cabo como se describe en Gärtner *et al.* (1993). El análisis de los pregnanos obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de GC-MS como se describe en Gavidía *et al.* (2007). Estos resultados mostraron que la proteína purificada presenta actividad progesterona 5β-reductasa y es capaz de catalizar la reacción de reducción de progesterona a 5β-pregnano-3,20-diona. Además, al igual que *P5βR*, la forma recombinante de *P5βR2* puede catalizar la reducción de diferentes esteroides con estructura tipo 3-oxo^Δ^{4,5}, aunque la mayor especificidad de sustrato se obtuvo con la progesterona. La actividad progesterona 5β reductasa de *P5βR2* requiere la presencia de la molécula NADPH en lugar de NADH, como cofactor, además la reacción catalizada por dicha enzima es irreversible.

Por otro lado se analizaron los parámetros cinéticos de la proteína recombinante obtenida frente a NADPH o progesterona. Para ello se incubaron 20 μg de dicha proteína recombinante a una temperatura de 30°C en presencia de distintas concentraciones de NADPH (0-150 μM) o de progesterona (0-300 μM). El valor aparente de K_m para la progesterona fue de 29.9 μM con una V_{max} de 29.5 $\mu\text{kat/kg}$, mientras que los valores obtenidos en presencia de NADPH fueron para la K_m de 21.4 μM con una V_{max} de 39.4 $\mu\text{kat/kg}$. La reacción óptima de reducción de la progesterona por la enzima recombinante P5 β R2 se produjo a pH 7.0-7.5. Comparando los parámetros cinéticos de P5 β R2 frente a los de P5 β R descritos por Gavidia *et al.* (2007), se observa que P5 β R presenta mayor especificidad frente a NADPH y progesterona que P5 β R2 (ratios V_{max}/K_m), aunque P5 β R2 muestra mayor afinidad aparente frente a la progesterona que P5 β R (Tabla 1).

TABLA 1

Parámetros cinéticos de las proteínas recombinantes P5 β R y P5 β R2

	Progesterona			NADPH		
	V_{max} ($\mu\text{kat/kg}$)	K_m (μM)	V_{max}/K_m	V_{max} ($\mu\text{kat/kg}$)	K_m (μM)	V_{max}/K_m
P5 β R*	57	39.1	1.5	94.7	7.9	12.0
P5 β R2	29.5	29.9	1.0	39.4	21.4	1.8

*Valores tomados de Gavidia *et al.* (2007)

Ejemplo 4

Patrón de expresión del gen P5 β R2 en plantas D. purpurea

Para conocer el patrón de expresión del gen de la presente invención, se utilizaron plantas *D. purpurea*. Dicho patrón de expresión se comparó con el que presentaba el gen P5 β R en las mismas plantas. La extracción del RNA de diferentes tejidos de dichas plantas se realizó de acuerdo con el método descrito por Steimle *et al.* (1994), excepto para las muestras de las raíces donde se modificó dicho método de extracción como describe Roca-Pérez *et al.* (2004). Para eliminar cualquier potencial contaminación del RNA con DNA, el RNA total se trató con DNase I (Takara), de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Para la reacción de transcripción inversa se utilizaron 5 μg de RNA y 50 unidades de la enzima SuperScript II RT (Invitrogen) en presencia de 40 unidades del inhibidor de la ribonucleasa recombinante (Invitrogen). Para las reacciones de RT-PCR semicuantitativa, se utilizaron dos cebadores específicos del gen P5 β R cuya secuencia es SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO: 10; otros dos cebadores específicos del gen P5 β R2 SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO: 12 y como control interno se utilizó el gen de la actina, cuyos cebadores fueron SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Los análisis cuantitativos de la expresión génica se realizaron mediante la técnica de RT-qPCR (Real Time-PCR) utilizando la Master Mix "SYBR Green PCR" (Applied Biosystems) y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Después de la extracción del RNA y de la realización de la transcripción inversa, se utilizaron 300 ng de cDNA para medir la expresión génica de P5 β R, P5 β R2 y actina (control interno). Los cebadores utilizados en cada uno de los casos fueron, para el gen P5 β R: SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO: 16; para el gen P5 β R2: SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO:18 y para el gen de la actina: SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. Los resultados de expresión obtenidos mediante la técnica de Real Time-qPCR se expresaron como n veces frente al valor control.

Mediante RT-PCR se comparó la expresión génica de P5 β R2 y P5 β R en diferentes partes de las plantas *D. purpurea*: flores, hojas, tallo, zona vascular de la parte basal de las hojas y raíces. Los resultados muestran que la expresión del gen P5 β R2 se produce en todas las partes de la planta analizadas, al igual que la expresión de P5 β R. Se observa que la expresión mayoritaria de P5 β R2 se produce en las hojas y en las flores, y la minoritaria en la raíz, siendo ésta apenas apreciable (Figura 1A).

Mediante Real Time-qPCR se comparó el nivel de expresión de los genes P5 β R y P5 β R2 en muestras de hojas de plantas *D. purpurea*. Como se observa en la Figura 1B, el gen P5 β R2 representa únicamente el 1.5% de expresión respecto de P5 β R en condiciones ambientales normales.

Ejemplo 5

*Expresión inducible del gen $P5\beta R2$ en condiciones de estrés abiótico: temperaturas altas, bajas y exceso de salinidad en el medio, en plantas *D. purpurea**

La presencia de dos genes diferentes $P5\beta R$ y $P5\beta R2$, que transcriben dos proteínas con idéntica actividad, progesterona 5β reductasa, implicadas en la síntesis de cardenólidos en plantas, hizo pensar si, la expresión de dichos genes o de uno de ellos, podría modificarse en respuesta a condiciones de estrés, tales como temperaturas altas o bajas, exceso de sales en el medio, etc.

Para demostrar si la expresión del gen $P5\beta R2$ se modifica como respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico se utilizaron plantas *D. purpurea* de 2 meses de edad que habían sido cultivadas en similares condiciones y durante el mismo tiempo. Un grupo de plantas fue expuesto a bajas temperaturas (4°C) durante 2 y 4 días, otro grupo de plantas se expuso a altas temperaturas (40°C) durante 1, 2 y 4 horas, un tercer grupo de plantas fue sometido a estrés salino conseguido por medio del riego de las mismas con una solución de 250 mM de NaCl durante 6, 24 y 48 horas y un cuarto grupo de plantas control que no fue sometido a ningún tipo de tratamiento. Después de cada uno de los tiempos mencionados se recogían muestras de las hojas de dichas plantas para analizar los niveles de expresión génica de $P5\beta R2$ y de $P5\beta R$ y observar el efecto producido por dichos tratamiento en sus niveles de expresión respecto de las muestras de hojas de las plantas control.

Mediante análisis de RT-PCR (como se describe en el ejemplo 4), observamos que los niveles de expresión de $P5\beta R2$ en muestras de hojas de plantas control son inapreciables en relación a la expresión del gen $P5\beta R$ en las mismas plantas (Figura 2). En cambio, en las muestras de hojas de plantas que habían sido sometidas durante distintos tiempos a temperaturas altas, bajas y a altas concentraciones salinas en el suelo, se produce un incremento en la expresión de $P5\beta R2$, respecto a las muestras de hojas de plantas control. Se produce un máximo en la expresión de $P5\beta R2$ a las 2 h en condiciones de bajas temperaturas (Figura 2B), a las 4 h en condiciones de altas temperaturas (Figura 2A) y a las 24 h en condiciones de alta salinidad (Figura 2C). Como se puede observar en las Figuras 2A y B, la expresión del gen $P5\beta R2$ disminuye hasta niveles basales 4 h después de ser las plantas sometidas a temperaturas altas y bajas, en cambio, la expresión génica de $P5\beta R2$ continúa incrementada 48 h después de someter a la planta a altas concentraciones de sal en el medio (Figura 2C).

Los niveles de expresión del gen $P5\beta R$ no se vieron afectados con ninguna de las condiciones estresantes, exceso de salinidad en el medio, altas y bajas temperaturas, a las que fueron sometidas las plantas, observándose un nivel de expresión constante tanto en las muestras de las hojas de las plantas control como en las muestras de las plantas sometidas a los diferentes tipos de estrés abiótico antes mencionados. Estos resultados ponen de manifiesto que el gen $P5\beta R2$ es un gen inducible, incrementa su expresión en condiciones ambientales adversas como pueden ser temperaturas extremas (4°C y 40°C) y exceso de salinidad en el medio. El patrón de expresión de $P5\beta R2$ que en condiciones normales apenas es apreciable, podría ser un ejemplo más, de gen inducible en condiciones de estrés. La expresión de los genes de respuesta a estrés es una expresión “silenciosa”, apenas apreciable en condiciones normales y de inducción rápida por condiciones de estrés.

Ejemplo 6

*Expresión inducible del gen $P5\beta R2$ como respuesta a daños mecánicos (cortes o heridas) en plantas *D. purpurea**

Como hemos mencionado anteriormente el gen $P5\beta R2$ transcribe una proteína con actividad progesterona 5β reductasa que está implicada en la síntesis de cardenólidos en plantas. Estas moléculas, son muy utilizadas por las plantas que las sintetizan como mecanismo de defensa frente a posibles depredadores, como pueden ser los herbívoros. Por este motivo se estudió si el gen $P5\beta R2$ incrementaba su expresión en respuesta a daños mecánicos de tipo cortes o heridas, producidos en las hojas de las plantas *D. purpurea*. Para ello se realizaron agujeros de 1 mm de diámetro a través de la lámina de la hoja, produciendo un daño aproximado del 5% del área total de la hoja. Después de producido el daño se recogieron muestras de hojas de dichas plantas a tiempos cortos, 1 hora, hasta tiempos largos, 72 horas, para compararlas con muestras recogidas de hojas de plantas control, que no habían sido sometidas a ningún tipo de daño.

En la figura 3 A y B se observa mediante ensayos de RT-PCR que la expresión del gen $P5\beta R$ en hojas de *D. purpurea* sometidas a daño mecánico a lo largo del tiempo permanece constante e inalterable frente a la expresión de dicho gen en las hojas de plantas control que no han sufrido dicho daño. En cambio, la expresión de $P5\beta R2$ en las hojas de plantas control apenas es apreciable, pero después de producirles el daño mecánico se observan dos respuestas claramente diferenciables. En una primera respuesta se produce un incremento considerable y muy rápido (1 h) en la expresión de $P5\beta R2$ después de producirse el daño, ese incremento se sigue de un descenso también muy rápido de dicha expresión (2 h) llegando a valores similares a los encontrados en las hojas de plantas control. La segunda respuesta es más lenta pero se mantiene en el tiempo, se observa un incremento en la expresión de $P5\beta R2$ a las 3 h de producido el daño mecánico y dicho incremento se mantiene de forma gradual hasta 15 h después de haber producido el daño en la planta.

Para averiguar durante cuanto tiempo se mantenía incrementada la expresión de $P5\beta R2$ después de producido el daño mecánico en la planta, se extrajeron muestras de hojas de plantas que habían sido sometidas a un daño de tipo

mecánico a diferentes tiempos, 6, 8, 24, 48 y 72 horas y se analizó la expresión de *P5βR2* y *P5βR* mediante Real-Time PCR. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3B. Los niveles de expresión del gen *P5βR* no sufrieron ninguna modificación respecto a los niveles de expresión del mismo en las plantas control, ni a lo largo del tiempo del estudio, al igual que había sucedido con los resultados obtenidos a tiempos cortos (Figura 3A). En cambio, los niveles de expresión del gen *P5βR2* después de someter a las plantas a daños de tipo mecánico, se mantuvieron incrementados respecto a las plantas control y al gen *P5βR* incluso 24 h después de producido el daño en la planta (Figura 3B). El nivel máximo de expresión del gen *P5βR2* se obtuvo a las 15 h después de producido el daño. Estos resultados demuestran claramente que la producción de un daño mecánico en la planta induce un incremento mantenido en el tiempo de la expresión génica de *P5βR2*.

Ejemplo 7

Efecto del tratamiento con diferentes elicitores químicos en los niveles de expresión de P5βR2 en hojas de D. purpurea

Se conoce de la existencia de diferentes moléculas implicadas en la señalización intracelular en condiciones de estrés. Entre estas moléculas destacan el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el etileno. Como se ha observado en los ejemplos anteriores, el gen *P5βR2* incrementa su expresión en situaciones estresantes para las plantas. Por este motivo se estudió si las moléculas antes mencionadas estarían implicadas también en el incremento de la expresión génica de *P5βR2*.

Las plantas fueron separadas en diferentes cabinas y rociadas con las siguientes soluciones químicas (junto con 0.1% de Tween-20): 100 μM de metil jasmonato disuelto en 0.1% de etanol, 2 mM de SA, 0.5 mM de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno y 20 mM de H₂O₂. Las plantas control se rociaron con 0.1% de Tween-20 en agua o etanol al 0.1%. Los análisis de expresión se realizaron mediante Real Time-qPCR en muestras de hojas recogidas de cada una de las plantas a las 4, 8, 24 y 48 horas después del tratamiento con los agentes químicos mencionados.

Como se observa en la Figura 4 los niveles de expresión de *P5βR* no sufrieron ninguna modificación a lo largo del tiempo respecto a los niveles de expresión de las plantas control, después de los tratamientos con SA, JA, ACC y H₂O₂. En cambio, los niveles de expresión de *P5βR2* se incrementaron en respuesta a los tratamientos con ACC y H₂O₂ respecto a los niveles de expresión en las plantas control, mientras que el tratamiento con SA y JA no modificó los niveles de expresión génica de *P5βR2* respecto a las plantas control. Por lo tanto, estos resultados indican que la expresión de *P5βR2* está regulada por H₂O₂ y ACC.

Ejemplo 8

Medida de la concentración de cardenólidos a lo largo del tiempo en hojas de plantas D. purpurea sometidas a daños de tipo mecánico

Se seleccionaron plantas *D. purpurea* de 2 meses de edad que habían crecido en idénticas condiciones. Se realizaron agujeros de 1 mm de diámetro a través de la lámina de la hoja, produciendo un daño aproximado del 5% del área total de la hoja. Se midió la concentración de cardenólidos totales en dichas hojas a lo largo de diferentes tiempos. Para cada uno de los tiempos estudiados se realizó el daño mecánico en dos plantas diferentes y se extrajeron los cardenólidos también por duplicado en cada una de dichas plantas para evitar la variabilidad interindividual. Para tomar un valor de concentración de cardenólidos totales de referencia de cada una de las plantas se extrajeron algunas hojas antes de producirles el daño mecánico (t=0), y se usaron como controles, el resto de las hojas fueron sometidas al daño mecánico.

Los cardenólidos totales se extrajeron como se describe en Roca-Pérez *et al.* (2004) y se analizaron mediante HPLC de acuerdo con lo descrito en Gavidia y Pérez-Bermúdez (1997). La identificación y cuantificación de los cardenólidos totales se realizó mediante cromatografía líquida utilizando estándares comerciales específicos (Sigma).

Como se observa en la gráfica de la Figura 5, el daño mecánico producido en las hojas de las plantas de *D. purpurea* produjo un incremento en la síntesis de los cardenólidos totales con dos respuestas totalmente diferenciables. En primer lugar se produjo un incremento máximo a las 4 h después de producido el daño, que disminuyó hasta llegar a los niveles de las plantas control a las 6 h. Posteriormente se observa una segunda respuesta en la que se produce un incremento paulatino y mantenido en la concentración de cardenólidos totales hasta los 5 días después de producido el daño mecánico. Este incremento no llegó a alcanzar los niveles de concentración de cardenólidos totales obtenidos durante la fase de respuesta temprana. (Figura 5).

Los valores normales de concentración de cardenólidos totales en plantas no sometidas a estrés están alrededor de 1 mg/g de peso seco de hoja. En cambio, la concentración encontrada en plantas sometidas a estrés es de 1.6 mg/g peso seco.

Referencias

1. Gärtner D E., Seitz H.U. 1993. Enzyme activities in cardenolide accumulating mixotrophic shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. *J. Plant Physiol.* 141: 269-275.

ES 2 359 689 A1

2. **Gavidia I., Pérez-Bermúdez P.** 1997. Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry*. 45: 81-85.

3. **Gavidia I, Tarrío R, Rodríguez-Trelles F, Pérez-Bermúdez P, Seitz H U.** 2007. Plant progesterone 5beta-reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5betaR from *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*. 68: 853-64.

4. **Harborne, J. B.,** 1982. Introduction to Ecological Biochemistry, Second ed. *Academic Press, New Cork*.

5. **Malcolm S B., Zalucki M P.** 1996. Milkweed látex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defence paradox. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 193-196.

6. **Pearson A, Budin M, Brocks J J.** 2003. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15352-15357.

7. **Roca-Pérez L, Boluda R, Gavidia I, Pérez-Bermúdez P.** 2004. Seasonal cardenolide production and *Dop5βr* gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry* 65:1869-1878.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

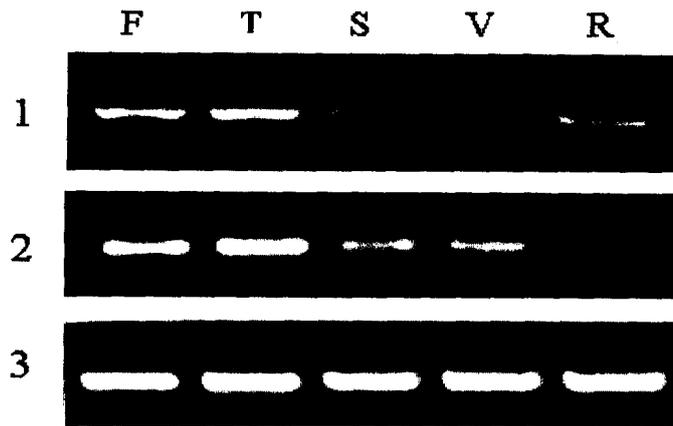
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia nucleotídica aislada de plantas representada por SEQ ID NO:4 que codifica para una proteína, representada por SEQ ID NO:5, con actividad progesterona 5β -reductasa, capaz de incrementar la síntesis de cardenólidos en plantas como respuesta a condiciones de estrés de tipo biótico, abiótico y/o tratamiento con elicitores químicos.
- 10 2. Secuencia según la reivindicación 1 **caracterizada** porque la planta se selecciona entre los géneros *Digitalis*, preferentemente *D. purpurea*, *D. grandiflora*, *D. davisiana*, *D. ferruginea*, *D. ciliata*, *D. viridiflora*, *D. laevigata*, *D. minor*, *D. obscura*, *D. parviflora*, *D. dubia*, *D. lutea*, *D. lanata*, e *Isoplexis*, preferentemente, *I. sceptrum*, *I. chalcantha*, *I. canariensis*, *I. isabelliana*, y otras especies filogenéticamente relacionadas, preferentemente *Veronica polita* y *Plantago major*.
- 15 3. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizada** porque las condiciones de estrés abiótico se seleccionan entre: altas temperaturas, preferentemente por encima de 40°C; bajas temperaturas, preferentemente por debajo de 4°C; alta salinidad en el medio, preferentemente por encima de 250 mM de NaCl.
- 20 4. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizada** porque las condiciones de estrés biótico son de tipo mecánico, preferentemente en forma de heridas o cortes en la planta.
- 25 5. Secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 **caracterizada** porque los elicitores químicos se seleccionan entre: etileno y especies reactivas de oxígeno, preferentemente H_2O_2 .
- 30 6. Vector de expresión que comprende y expresa la secuencia nucleotídica representada por SEQ ID NO:4.
- 35 7. Célula no humana transformada con el vector de expresión de la reivindicación 6.
- 40 8. Célula según la reivindicación 7 **caracterizada** por ser la cepa de *E. coli* CECT 7463.
- 45 9. Uso de las células de las reivindicaciones 7 u 8 para la producción de proteína recombinante con actividad progesterona 5β -reductasa.
- 50 10. Uso según la reivindicación 9 en que la proteína recombinante obtenida está representada por SEQ ID NO:5.
- 55 11. Uso de la secuencia nucleotídica de las reivindicaciones 1 a 5, para la producción de proteína recombinante con actividad progesterona 5β -reductasa.
- 60 12. Uso según la reivindicación 11 en que la proteína recombinante obtenida está representada por SEQ ID NO:5.
- 65 13. Uso de la secuencia nucleotídica de las reivindicaciones 1 a 6 para producir cardenólidos.
14. Uso según la reivindicación 13 en que los cardenólidos se producen en plantas, preferentemente de los géneros *Digitalis* e *Isoplexis*.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 en que las plantas son sometidas a estrés biótico o abiótico y/o tratamiento con elicitores químicos.

Figura 1

A



B

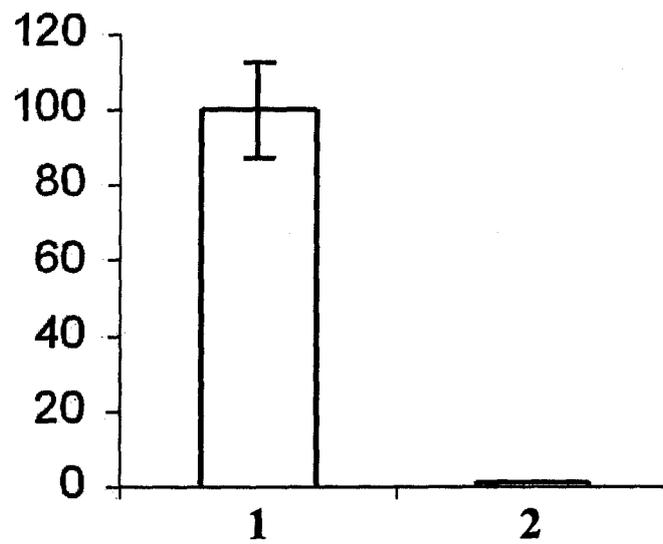


Figura 2

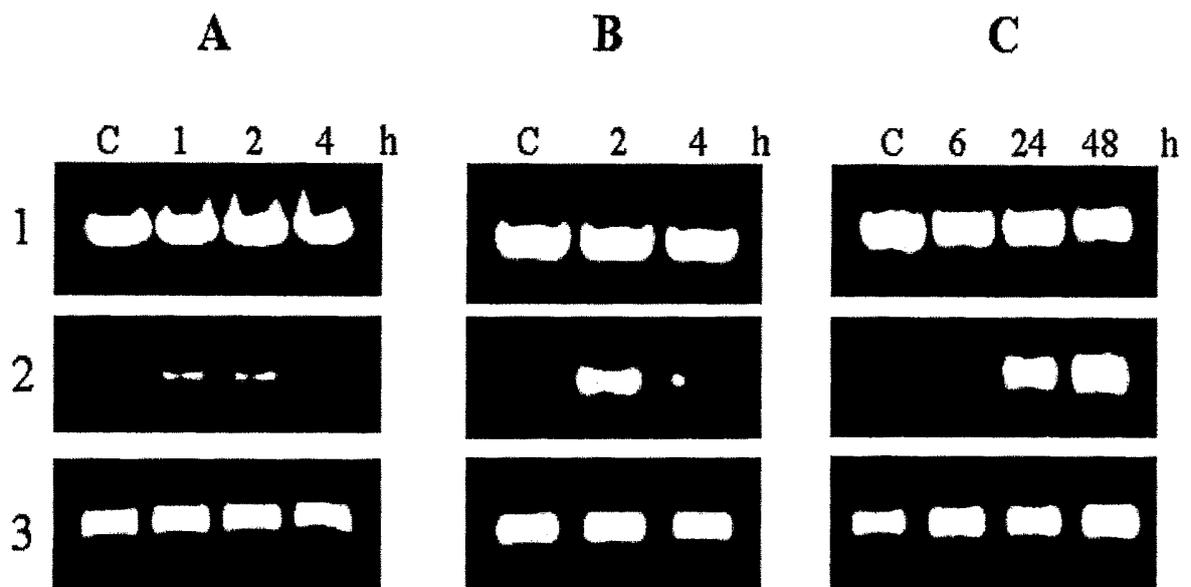
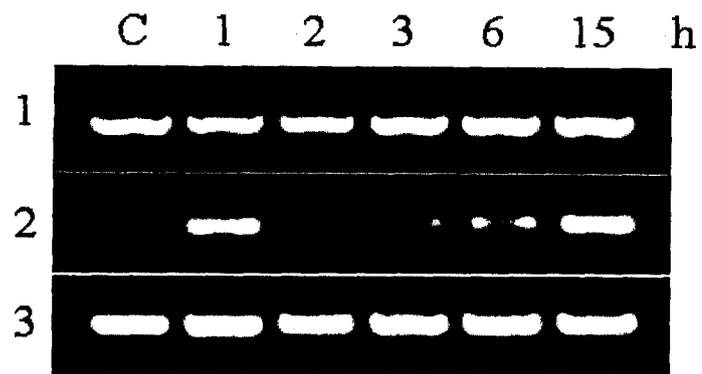


Figura 3

A



B

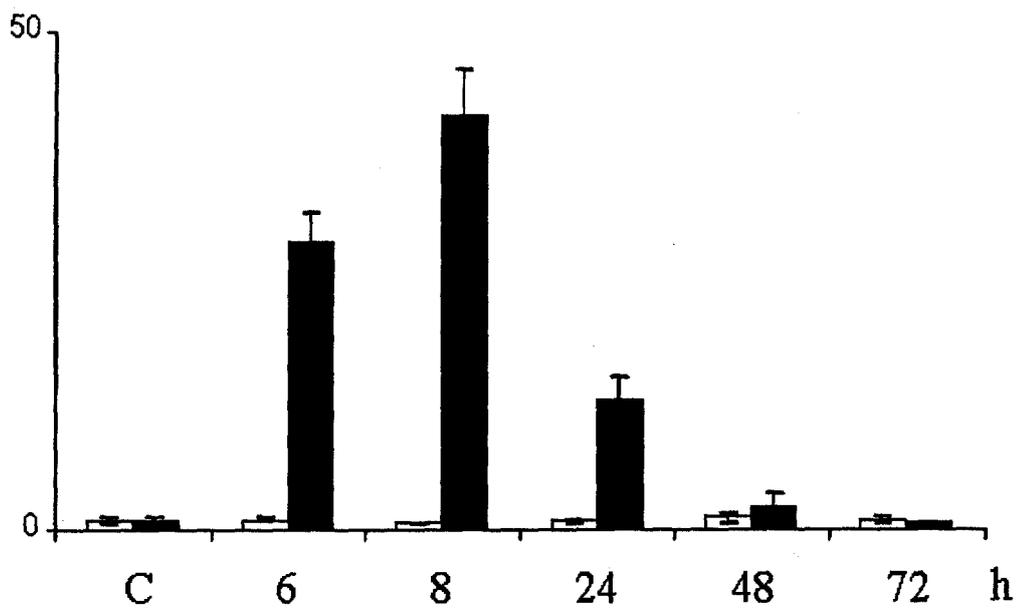


Figura 4

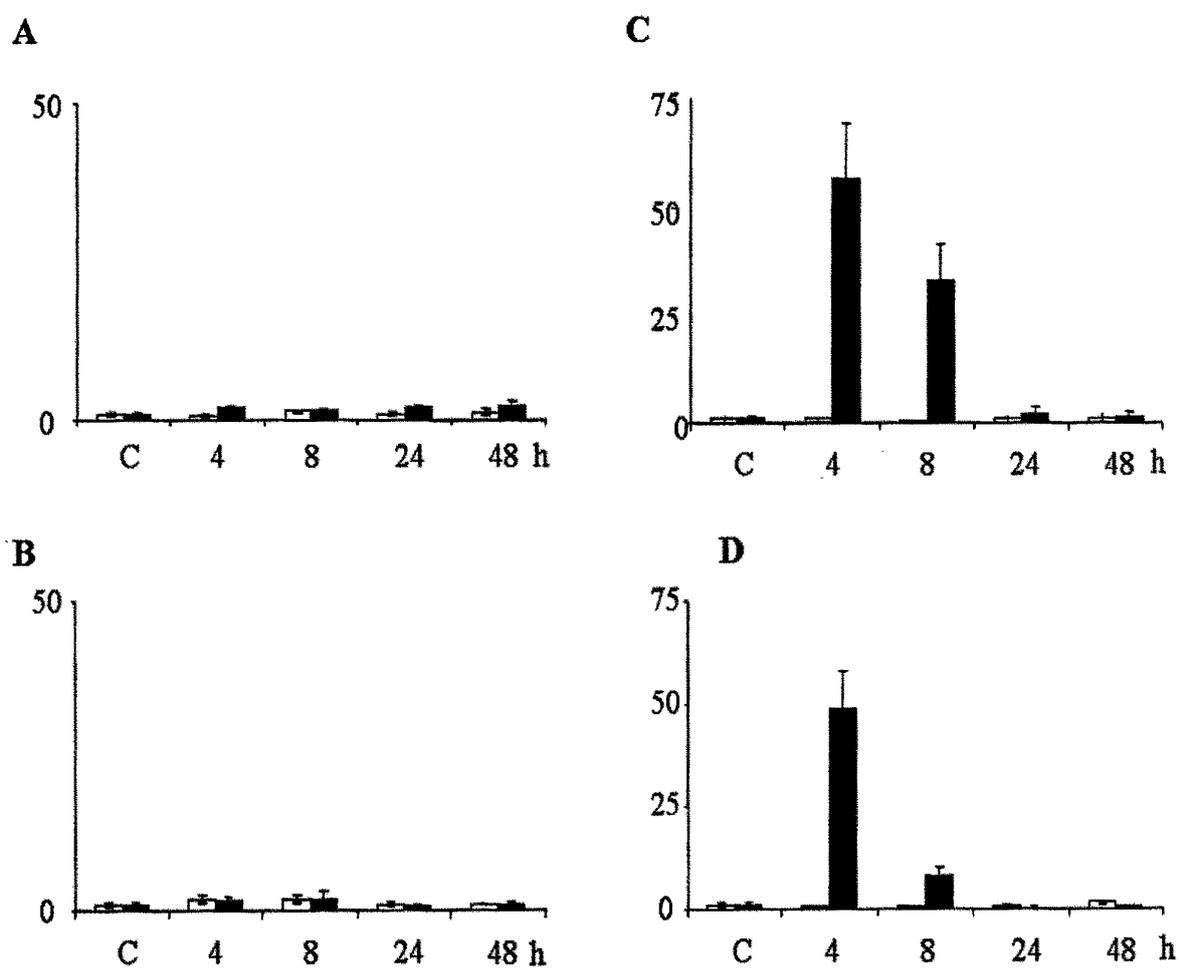
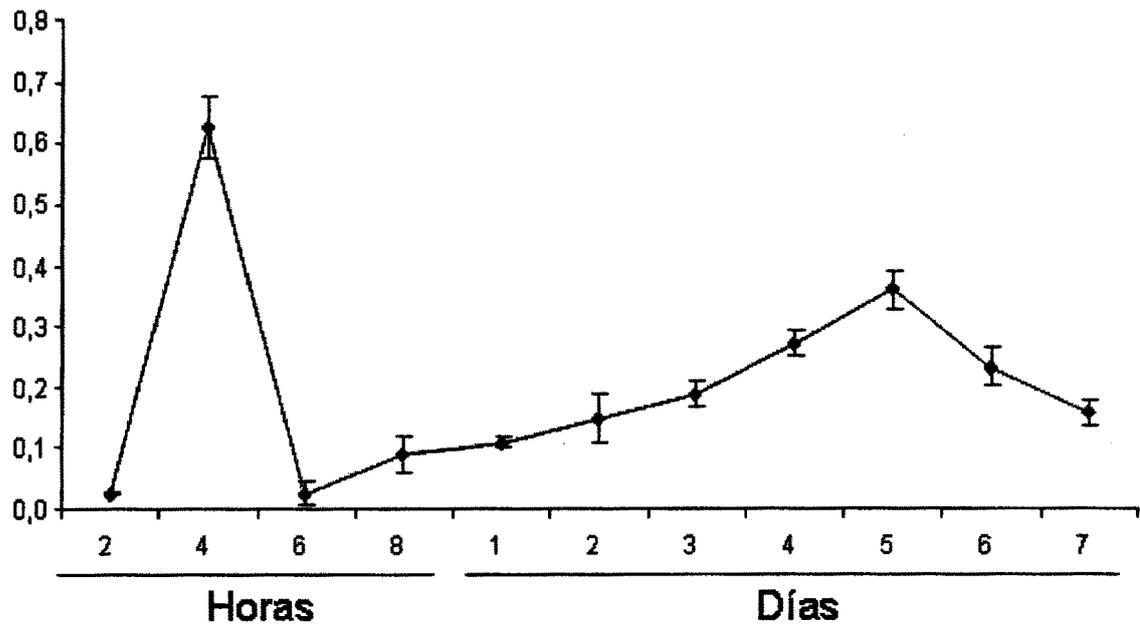


Figura 5



ES 2 359 689 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Valencia

5 <120> USO DEL GEN P5betaR2 PARA INCREMENTAR LA SÍNTESIS DE CARDENÓLIDOS

<130> P-02521

10 <160> 18

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
<211> 850
<212> DNA

20 <213> *Digitalis purpurea*

<220>
<221> gen

25 <222> (1)..(850)
<223> P5betaR

<400> 1

30

acgtgttcta cgttacctgg gctaatcgat ccaccgaacc agaaaactgc gaagccaata 60

35 gcaaaatggt caggaacgtg cttgatgcag ttatccctaa ttgcccctaat ttgaagcaca 120

tctcattgca gactgggagg aagcattaca tgggaccatt tgaatcctac gggaaaatag 180

40 aatcccatga tccaccctac actgaggata tgcccagggt gaagtacatt aacttttact 240

atgatttaga ggatattatg cttgaggagg tggagaagaa ggagggtttg acttggtcag 300

ttcatcgtcc agggaaacata ttcgggtttt ctccatatag tatgatgaat ttggtgggca 360

45 ccctgtgtgt ttatgcagct atttgcaaac acgaggggaa ggttttgagg tttcctgggt 420

gtaaggctgc gtgggatggg tactcggatt gctctgatgc agatttgata gcgagcatc 480

50 atatttgggc ggcagtggat ccttatgcaa aaaatgaggc cttaaatgtg agtaatggag 540

atgtgtttaa atggaagcat ttttgggaagg tgttggcggg gcagtttggg gtagagtgtg 600

55 gagagtatgg agaaggggtg gat ttgaaat tgcaggattt gatgaagggg aaggaggcgg 660

tttgggagga aatcgtgagg gagaatgggt tgacacctac gaaactgaag gatatcggga 720

tttgggtggt tggtgatggt atacttggga atgaatggtt tctggatagt atgaataaga 780

60 gcaaggagca tggctttttg ggatttagga actccaagaa tgcgttcatt tcttgattg 840

acaaggcaaa 850

65

ES 2 359 689 A1

<400> 4

5	ctctattcct aaaaccctaa tccctcttta tttccttttc ctttccttat ggtttgcttt	60
	gcgggcaggc ccagtactcg tgaatcgtga tacataactt tattttggtc tgcttgaaac	120
10	taagcccatt cagttttttc ttattaagga accagacttc ggcccattac atataatcca	180
	tcttatttgg ataaacgaat aatgatgaaa ttacaagtga aacttaaaaa taagaataaa	240
15	caccgaaaat aaaacattga atgatgacga cgttaaataa aaacatatcc taaagaaatt	300
	ttattcgaac caattggaat cgaagaattc ggaagactaa taattcggat tgtaatcgtt	360
20	tatttctgaa aagtattgta ttatagtgta aaaatataaa atgaagggtta tttatgaaga	420
	ttttcaatat ataaaggggt aagggcaatg tggtagtttt gttatttttt gttattgtgc	480
25	ttaataattt atattactgt acaattctca attatcgact tagattcaca aagccctctc	540
	gccaaaatat aaaaccttgt gcggatctgt taactatttc ccatcactcg tgagaatatic	600
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 359 689 A1

	atagttttac tctattaatg atgagataac tctctcttct tacaagaact ttaaggagt	660
5	cgcgccccca aatttttaca tggattaga gagcatggac ccaagtgacg tcgtattttg	720
	gaccgctagt ccctcttttg cccgactcta tcttcaactc ttggaccggt ggtccctaca	780
10	ctgctataat ccctcttttg ctctcggtat ggagctcgat attgctctat aaatatcatg	840
	agattttcta taaatttacc gttgcgcgaa aatttgact ttatctatta ttacttctca	900
15	tttatccata ttgggtacca cgttagaaat ttctcgtgca taacataaaa atattttatt	960
	taccaccac tttactttat ttattttctc tcatacttta tcattattta ttcactctct	1020
	ttcatatfff aatatccatt aatattttta actattatat ttattcattt cttattatff	1080
20	taatfffff ttttaatatt tacacccaaa tttttttaa aatfffcaa taggacggga	1140
	caggattagt ataatatata ccccatacc cacataaac aggaacattt aacgcacaat	1200
25	atftacatac cttataaact aatftcctcc atatfggtct catatcgcaa ftcaaacaaa	1260
	ttcgcggtag gcatagaaca aacacacatg ggtgttcaaa tccaacaagt acaagttgct	1320
30	aacatfffga agtgtctcat agtcatatct cttacgtaaa caaatccac acgaaaacgt	1380
	taaattagag taggtgattg tcgtttatta tatatatfff tattcttaca ttatfffga	1440
35	ttcacgactc gaaccaaga cctatagttc accagtgga caacttatcg acgctcaag	1500
	actgtacaa tctacaatta tctccactc cacatagaac gcagtatffg atggaaatff	1560
40	tttgtcctff taggtaagtt acgggctatg atcttctatc tcatffcat tctcattcta	1620
	ttttacacta tgtatatata cagagaaaag aaaagtagtg aaaagtagtg tttagtagtc	1680
	tatgttgaaa cttgaaaagt cacttagaat agtcaaactt gaaattagcc ttgcagcgcc	1740
45	tcgtgctatt ctaatcagtt aataatggcg gccttgacgc gcctcgtgca gttttffff	1800
	tgttffffat attaggtctc actatatata tatatatata tatatatata tatatatata	1860
50	tatatatata tatatatata tatataagaa tcttaagaca ctttagttat ataaatacct	1920
	ccaaaacaag agaagatata tcacaactff tgttgtctaa tftaacctt caatctctct	1980
55	cagttcttct tctacatcat catcgatatg tataccgaca caacgacttg gtggtacaaa	2040
	agatccattg gcgatattga acaggtatga aattcgaatt tggagaatat gtttattgta	2100
60	acttagtgtc actctaagta atfftatcgt cttacctaaf tgtgtcgcag aaaaatgtgg	2160
	aaacaaatgg tgttgcctta aactacaaga gtgtcgcct catagttggg gtcaccggca	2220
	tcgccggaag cggctctggct gaaactctat ccaagtccga cacgccaggt ggaccgtgga	2280
65	aggtctacgg ggtcgcacgc cgccttgtc cagagtggt agccaaactc cacgtcagct	2340
	acatccaatg tgacatcgga tcaactgat acacgtcagc caaattgtct ccctgtccg	2400

ES 2 359 689 A1

```

    acatcactca cattttctac gtgtcctgga ccggatccga agattgtgac aagaacgcta      2460
    tcatgttcaa gaacatcctc gattcagtga tccccaatgc tccaaatctc aaacacatct      2520
5    ccctccaaac aggaatcaag cactactggg gcaacatggt tgatgaaatg gacaccacga      2580
    atgtatccca tgattgtccc ttttatgaaa acatgcctag acttagacaa cctaatttct      2640
10   attacaatct agaagaccta ctctatgaag cctgcgggac acaaaatggt gccctaacat      2700
    ggaccgtcca tcgccccgcc ctaattttcg ggttctcacc atgtagtttg atgaacatag      2760
15   tcgcgaccct aagtgtttat gccgcgattt gcaaatatga raacaagcca ttggtgtata      2820
    ccgggacaga aacgtcgtgg aattgtttag tggatgctgt ggattcggat ttgttagcgg      2880
    atcacttggg atggggtgcg atcagcccaa acgcgaagaa ccaagctttc aatatcaaca      2940
20   atggcgacgt ttttaaagtg aaacatatat ggaaagtgtt ggcggatcag tttgagattg      3000
    agtttgtggg ttatgaaggg aaggaaccgg tgtcattgga ggttctcatg aaggataagg      3060
25   actcgggatg ggacgagata gtggaaaggt acgatcttgt cccacgaaa cttaaggaca      3120
    tagcggcggt ttggttcgcg gatgtggcgt ttagcatcga gggggcagtt tcgagcatga      3180
30   acaagaacaa ggagtttggg ttcattgggt tcagggatag caccaagtct tttatatctt      3240
    ctgttaacaa agtgagaact tatagatttg tcccttga      3278

```

```

35 <210> 5
    <211> 394
    <212> PRT
    <213> Digitalis purpurea

```

```

40 <220>
    <221> Péptido
    <222> (1)..(394)
45 <223> P5betaR2

```

```

<400> 5

```

```

50   Met Tyr Thr Asp Thr Thr Thr Trp Trp Tyr Lys Arg Ser Ile Gly Asp
     1           5           10           15
55   Ile Glu Gln Lys Asn Val Glu Thr Asn Gly Val Ala Leu Asn Tyr Lys
     20           25           30
60   Ser Val Ala Leu Ile Val Gly Val Thr Gly Ile Ala Gly Ser Gly Leu
     35           40           45
65   Ala Glu Thr Leu Ser Lys Ser Asp Thr Pro Gly Gly Pro Trp Lys Val
     50           55           60
70   Tyr Gly Val Ala Arg Arg Pro Cys Pro Glu Trp Leu Ala Lys Leu His

```

ES 2 359 689 A1

	65	70	75	80
5	Val Ser Tyr Ile	Gln Cys Asp Ile Gly Ser Thr Asp Asp Thr Ser Ala		
		85	90	95
10	Lys Leu Ser Pro	Leu Ser Asp Ile Thr His Ile Phe Tyr Val Ser Trp		
		100	105	110
15	Thr Gly Ser Glu	Asp Cys Asp Lys Asn Ala Ile Met Phe Lys Asn Ile		
		115	120	125
20	Leu Asp Ser Val	Ile Pro Asn Ala Pro Asn Leu Lys His Ile Ser Leu		
		130	135	140
25	Gln Thr Gly Ile	Lys His Tyr Trp Gly Asn Met Val Asp Glu Met Asp		
		145	150	155
			160	165
30	Thr Thr Asn Val	Ser His Asp Cys Pro Phe Tyr Glu Asn Met Pro Arg		
		165	170	175
35	Leu Arg Gln Pro	Asn Phe Tyr Tyr Asn Leu Glu Asp Leu Leu Tyr Glu		
		180	185	190
40	Ala Cys Gly Thr	Gln Asn Gly Ala Leu Thr Trp Thr Val His Arg Pro		
		195	200	205
45	Ala Leu Ile Phe	Gly Phe Ser Pro Cys Ser Leu Met Asn Ile Val Ala		
		210	215	220
50	Thr Leu Ser Val	Tyr Ala Ala Ile Cys Lys Tyr Glu Asn Lys Pro Leu		
		225	230	235
			240	245
55	Val Tyr Thr Gly	Thr Glu Thr Ser Trp Asn Cys Leu Val Asp Ala Val		
		245	250	255
60	Asp Ser Asp Leu	Leu Ala Asp His Leu Val Trp Gly Ala Ile Ser Pro		
		260	265	270
65	Asn Ala Lys Asn	Gln Ala Phe Asn Ile Asn Asn Gly Asp Val Phe Lys		
		275	280	285
70	Trp Lys His Ile	Trp Lys Val Leu Ala Asp Gln Phe Glu Ile Glu Phe		
		290	295	300
75	Val Gly Tyr Glu	Gly Lys Glu Pro Val Ser Leu Glu Gly Leu Met Lys		
		305	310	315
			320	325

ES 2 359 689 A1

	Asp	Lys	Asp	Ser	Val	Trp	Asp	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Tyr	Asp	Leu	Val
					325					330					335	
5	Pro	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Phe	Trp	Phe	Ala	Asp	Val	Ala
				340					345					350		
10	Phe	Ser	Ile	Glu	Gly	Ala	Val	Ser	Ser	Met	Asn	Lys	Asn	Lys	Glu	Phe
			355					360					365			
15	Gly	Phe	Met	Gly	Phe	Arg	Asp	Ser	Thr	Lys	Ser	Phe	Ile	Ser	Ser	Val
		370					375					380				
20	Asn	Lys	Val	Arg	Thr	Tyr	Arg	Phe	Val	Pro						
	385					390										
	<210> 6															
	<211> 389															
25	<212> PRT															
	<213> <i>Digitalis purpurea</i>															
	<220>															
30	<221> Péptido															
	<222> (1)..(389)															
	<223> P5betaR															
35	<400> 6															
40	Met	Ser	Trp	Trp	Trp	Ala	Gly	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Lys	Leu
	1				5					10					15	
45	Glu	Glu	Asp	Asp	Ala	Pro	Pro	Lys	His	Ser	Ser	Val	Ala	Leu	Ile	Val
				20					25					30		
50	Gly	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Pro	Leu
				35				40					45			
55	Ala	Asp	Thr	Pro	Gly	Gly	Pro	Trp	Lys	Val	Tyr	Gly	Val	Ala	Arg	Arg
		50					55					60				
60	Thr	Arg	Pro	Ala	Trp	His	Glu	Asp	Asn	Pro	Ile	Asn	Tyr	Ile	Gln	Cys
	65					70					75				80	
65	Asp	Ile	Ser	Asp	Pro	Asp	Asp	Ser	Leu	Ala	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Thr
					85					90					95	
70	Asp	Val	Thr	His	Val	Phe	Tyr	Val	Thr	Trp	Ala	Asn	Arg	Ser	Thr	Glu
				100						105				110		

ES 2 359 689 A1

Phe Leu Asp Ser Met Asn Lys Ser Lys Glu His Gly Phe Leu Gly Phe
355 360 365

5 Arg Asn Ser Lys Asn Ala Phe Ile Ser Trp Ile Asp Lys Ala Lys Ala
370 375 380

10 Tyr Lys Ile Val Pro
385

<210> 7

15 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Cebador 5'gen P5betaR2

25 <400> 7

atgtataccg acacaacgac ttgg

24

30 <210> 8

<211> 31

<212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 3'gen P5betaR2

40 <400> 8

tttttctgca gtcaaggac aaatctataa g

31

45 <210> 9

<211> 21

50 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Cebador 5' gen P5betaR para ensayos de RT-PCR

<400> 9

60 cctacgggaa aatagaatcc c

21

<210> 10

65 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

ES 2 359 689 A1

<220>

<223> Cebador 3' gen P5betaR para ensayos de RT-PCR

5 <400> 10

acaccacaca gttggtgaac

20

10

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador 5' gen P5betaR2 para ensayos de RT-PCR

20

<400> 11

atgaaatgga caccacaaat g

21

25

<210> 12

<211> 18

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Cebador 3' gen P5betaR2 para ensayos de RT-PCR

<400> 12

40

cttccttca taaccac

18

<210> 13

45 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador 5' gen actina

<400> 13

55

gccctattct gctcacag

18

60 <210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Cebador 3' gen actina

ES 2 359 689 A1

<400> 14		
	cctctctcag ttaggatc	18
5		
	<210> 15	
	<211> 19	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador 5' gen P5betaR para ensayos de PCR a Tiempo Real (Real Time-qPCR)	
	<400> 15	
20	gtggatttga aattgcagg	19
	<210> 16	
25	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador 3'gen P5betaR para ensayos de PCR a Tiempo Real (Real Time-qPCR)	
	<400> 16	
35	acaccacaca gttggtgaac	20
	<210> 17	
40	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador 5'gen P5betaR2 para ensayos de PCR a Tiempo Real (Real Time-qPCR)	
50	<400> 17	
	atgtataccg acacaacgac	20
55	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador 3'gen P5betaR2 para ensayos de PCR a Tiempo Real (Real Time-qPCR)	
65	<400> 18	
	ggacacgtag aaaatgtg	18



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200900314

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.01.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/53** (01.01.2006)
C07K14/415 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GAVIDIA, I. et al., 'Cloning and expression of two novel aldo-keto reductases from Digitalis purpurea leaves.', EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2002, Vol. 269, No. 12, paginas 2842-2850, ISSN 0014-2956, Resultados y Discusión.	1-15
A	GAVIDIA, I. et al., 'Plant progesterone 5beta-reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5betaR from Digitalis purpurea.', PHYTOCHEMISTRY, 2007, Vol. 68, No. 6, paginas 853-864, ISSN 0031-9422, todo el documento.	1-15
A	HERL, V. et al., 'Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5beta-reductase from Digitalis lanata Ehrh', PHYTOCHEMISTRY, 2006, Vol. 67, No. 3, paginas 225-231, ISSN: 0031-9422, todo el documento.	1-15
A	ROCA-PEREZ, L. et al., 'Seasonal cardenolide production and Dop5betar gene expression in natural populations of Digitalis obscura.', PHYTOCHEMISTRY, 2004, Vol. 65, No.13, paginas 1869-1878, ISSN 0031-9422, todo el documento.	1-15
A	HERL, V. et al., 'Molecular cloning and expression of progesterone 5beta-reductase (5beta-POR) from Isoplexis canariensis.', PLANTA MEDICA, 2006, Vol. 72, No. 12, paginas 1163-1165, ISSN 0032-0943, todo el documento.	1-15
A	HERL, V. et al., 'Using progesterone 5beta-reductase, a gene encoding a key enzyme in the cardenolide biosynthesis, to infer the phylogeny of the genus Digitalis.', PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION, 2008, Vol. 271, No. 1-2, paginas 65-78. ISSN: 0378-2697, todo el documento.	1-15
A	THORN, A. et al., 'The crystal structure of progesterone 5beta-reductase from Digitalis lanata defines a novel class of short chain dehydrogenases/reductases.', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2008, Vol. 283, No. 25, paginas 17260-17269, ISSN: 0021-9258, todo el documento.	1-15
P,X	PEREZ-BERMUDEZ, P. et al., 'Digitalis purpurea P5 beta R2, encoding steroid 5 beta-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis', NEW PHYTOLOGIST, Feb 2010, Vol.185, No. 3, paginas 687-700, ISSN: 0028-646X, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.12.2010

Examinador
J. Vizan Arroyo

Página
1/5

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

C12N, C07K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GAVIDIA, I. et al., <i>Eur. J. Biochem.</i> , (2002), <u>269</u> (12): 2842-50.	2002
D02	GAVIDIA, I. et al., <i>Phytochemistry</i> , (2007), <u>68</u> (6): 853-64.	2007
D03	HERL, V. et al., <i>Phytochemistry</i> , (2006), <u>67</u> (3): 225-31.	2006
D04	ROCA-PEREZ, L. et al., <i>Phytochemistry</i> , (2004), <u>65</u> (13):1869-78.	2004
D05	HERL, V. et al., <i>Planta Med.</i> , (2006), <u>72</u> (12):1163-65.	2006
D06	HERL, V. et al., <i>Plant Syst. Evol.</i> , (2008), <u>271</u> (1-2): 65-78.	2008
D07	THORN, A. et al., <i>J. Biol. Chem.</i> , (2008), <u>283</u> (25): 17260-9.	2008
D08	PÉREZ-BERMUDEZ, P. et al., <i>New Phytol.</i> , (2010 Feb), <u>185</u> (3): 687-700. Epub. 05.11.2009	05.11.2009

En D1-D6 se divulgan la clonación y caracterización de genes codificadores de diferentes enzimas con actividad progesterona 5 β -reductasa procedentes de diferentes especies del genero *Digitalis* y de la especie *Isoplexis canariensis*.

En D7 se analiza la estructura de la enzima progesterona 5 β -reductasa de *Digitalis lanata*.

En D8 se analiza el gen P5 β R2 de *Digitalis purpurea* codificador de una enzima con actividad esteroide 5 β -reductasa implicada en la biosíntesis de cardenólido.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

En los documentos D1-D4 se describe la clonación y caracterización de diferentes ADNc codificadores de enzimas progesterona 5 β -reductasa y procedentes de las especies *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata* y *Digitalis obscura* (cf. D1: Resultados: 'Isolation and sequence analysis of aldosa reductase (AR) cDNAs from *D. purpurea*', 'Expression of DpAR genes'; Discusión. D2: Resultados y Discusión: 'Isolation of the cDNA encoding P5 β R', 'Structural features of P5 β R', 'Gene expresión analysis'. D3: Resultados y Discusión. D4: Resultados y Discusión.). Sin embargo, ninguna de dichas secuencias comparte todas las características estructurales y funcionales de las secuencias de la invención, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 5. Por consiguiente, el producto objeto de la reivindicación 1 es nuevo sobre la base de los documentos D1-D4. Según lo expuesto anteriormente, el objeto de la reivindicación 1 en combinación con las reivindicaciones dependientes 2-15 también se considera que es nuevo.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-15, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1.

2.1.1. El documento D1 constituye el estado de la técnica más próximo. En él se describe la clonación y caracterización de dos aldo-ceto reductasas, DpAR1 y DpAR2, aisladas en hojas de *Digitalis purpurea*. Ambas presentan una actividad progesterona 5 β -reductasa. Además, la expresión de los genes DpAR aumenta como respuesta a condiciones de estrés abiótico y daños mecánicos (cortes, heridas) (cf. D1: Resultados: 'Isolation and sequence analysis of aldosa reductase (AR) cDNAs from *D. purpurea*', 'Expression of DpAR genes'; Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas secuencias de nucleótidos codificadoras de enzimas con actividad progesterona 5 β -reductasa que son capaces de incrementar la síntesis de cardenólidos en plantas.

2.1.3. La solución propuesta es la secuencia de nucleótidos SEQ ID No 4 codificadora de la proteína SEQ ID No 5 (P5 β R2) con actividad progesterona 5 β -reductasa y aislada de *Digitalis purpurea* (cf. Ejemplo 1, página 13, línea 22 – página 14, línea 22). En el estado de la técnica se han descrito diferentes ADNc de origen vegetal codificadores de progesterona 5 β -reductasas (cf. D1-D5). Dichas enzimas reducen la progesterona a 5 β -pregnano-3,20-diona, es decir, catalizan la primera etapa de la ruta de biosíntesis de cardenólidos. En particular, se ha descrito el aislamiento y caracterización en *Digitalis purpurea* de dos proteínas pertenecientes a la familia de las progesterona 5 β -reductasas, denominadas DpAR1 y DpAR2. La expresión de los correspondientes genes codificadores se incrementa bajo condiciones de estrés abiótico y daño mecánico (cf. D1: Resultados y Discusión).

La secuencia SEQ ID No 4 objeto de la invención ha sido aislada en una librería de ADNcs de *Digitalis purpurea* y se caracteriza por que codifica a la proteína SEQ ID No 5 con actividad progesterona 5 β -reductasa y porque su expresión se induce en condiciones de estrés abiótico y daño mecánico (cf. Página 8, línea 9 - página 11, línea 16; Ejemplos 1, 4, 5 y 6).

Por consiguiente, tanto las secuencias de la invención como las secuencias descritas en D1 comparten la misma actividad enzimática (progesterona 5 β -reductasa) y el mismo patrón de expresión génica. Debido a que en la solicitud no se especifica el efecto sorprendente e inesperado derivado de la utilización de las secuencias de la invención en la biosíntesis de cardenólidos con respecto a la utilización de las secuencias descritas en D1, se considera que la solución propuesta por el objeto de la reivindicación 1 al problema técnico planteado es una alternativa no inventiva a la solución existente en el estado de la técnica que no requeriría de la aplicación de conocimientos técnicos inventivos por parte del experto en la materia. Además, dichas soluciones, aunque requiriendo un trabajo considerable, no presentaron ninguna dificultad técnica imprevisible que, en el caso de haberse planteado, hubiera cuestionado la expectativa por parte del experto en la materia de llevarlas a cabo con éxito.

En base a lo expuesto anteriormente, se concluye que el objeto de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-15 no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-15 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.