



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 673**

② Número de solicitud: 201030342

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/83 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **09.03.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.12.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Politécnica de Valencia (Titular al 50 %)

⑦ Inventor/es: **Darós Arnau, José Antonio;**
Bedoya Rojas, Leonor y
Martínez García, Fernando

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Vector para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares.**

⑦ Resumen:

Vector para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares.

La invención se refiere a un vector de expresión basado en la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus*, preferiblemente del virus del grabado del tabaco, que alberga una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga, preferiblemente para dos y más preferiblemente para tres proteínas heterólogas. Las proteínas heterólogas se expresan, en la célula transfectada con este vector, como parte de la poliproteína viral y se encuentran flanqueadas por secuencias de reconocimiento de la proteasa viral NlaPro, la cual es capaz de liberarlas de la poliproteína completa durante el procesamiento postraduccional. Por tanto, el vector de la invención es útil para la coexpresión de una o de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares en la misma localización subcelular. La invención también se refiere a la célula, preferiblemente vegetal, que comprende este vector de expresión, al polen y a la planta que comprenden esta célula, al germoplasma de esta planta y a los métodos para la obtención de al menos una, dos o tres proteínas heterólogas.

ES 2 370 673 A1

DESCRIPCIÓN

Vector para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la ingeniería genética y específicamente se refiere a un vector de expresión basado en la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus*, preferiblemente del virus del grabado del tabaco, cuyo cistrón de la RNA polimerasa viral N1b se encuentra delecionado para albergar una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga, preferiblemente para dos y más preferiblemente para tres proteínas heterólogas. Las proteínas heterólogas se expresan, en la célula transfectada con este vector, como parte de la poliproteína viral y se encuentran flanqueadas por secuencias de reconocimiento de la proteasa viral N1aPro, la cual es capaz de liberarlas de la poliproteína completa durante el procesamiento postraducciona. Por tanto, el vector de la invención es útil para la coexpresión de una o de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares en la misma localización subcelular.

15 **Estado de la técnica anterior**

Las plantas y sus virus forman una atractiva combinación desde el punto de vista de la biotecnología. El uso de las plantas como biofactorías despierta un gran interés debido a ventajas tales como el bajo coste de producción, la facilidad de escalado, la improbabilidad de que sus productos contengan patógenos humanos, el rico metabolismo que de por sí tienen las plantas o el hecho de poseer un sistema de modificación postraducciona de proteínas similar al de las células de mamíferos. A este potencial biotecnológico de las plantas hay que sumar la simplicidad genómica de los virus que las infectan.

25 En este sentido, los virus de plantas pueden ser una herramienta muy útil para programar la expresión de productos de interés en plantas huésped. Los virus de plantas como vectores de expresión aportan ventajas como son la rapidez en la producción o su capacidad intrínseca de manipular el control de la expresión génica del huésped para disparar la expresión de las proteínas “virales” a través, por ejemplo, de sus supresores de silenciamiento de RNA. Ejemplo de todo ello es que mediante sencillas manipulaciones de clones infecciosos de múltiples virus de plantas se han conseguido expresar productos génicos heterólogos (Shih, S. M., P. M. Doran, 2009, *Biotechnology Advances*, 27: 1036-1042).

Los potyvirus (género *Potyvirus*) son un grupo de virus de plantas que presentan una amplia diversidad, con más de cien especies de virus reconocidas, y muchas más propuestas, que infectan a un elevado número de especies vegetales de interés agronómico. Igualmente algunos potyvirus, como es el caso del virus del grabado del tabaco (TEV), infectan a más de cien especies en 19 familias de dicotiledóneas distintas, incluyendo plantas modelo y de interés agronómico (Fauquet, C. M., et al., 2005, *Elsevier/Academic Press*, London).

El genoma de los potyvirus está constituido por un RNA de polaridad (+) de 9,5 kb aproximadamente, unido en 5' a una proteína viral unida al genoma (VPg), con una cola poli(A) 3' y que se encapsida en viriones alargados y flexuosos (Riechmann, J. L., et al., 1992, *Journal of General Virology*, 73: 1-16). Este RNA codifica una poliproteína que es procesada de forma regulada por tres proteasas virales en diez productos génicos maduros aproximadamente, a los que probablemente hay que añadir el recientemente propuesto P3-PIPO. Las proteasas P1 y componente auxiliar (HC-Pro), en la región amino terminal de la poliproteína, catalizan su propio procesamiento, mientras que la proteasa N1aPro, o su versión no completamente procesada, N1a, en la que el dominio N1aPro está todavía unido al VPg, cataliza el resto de cortes proteolíticos en cis y en trans en la maduración de la proteína del TEV, reconociendo una diana de procesamiento conservada de siete aminoácidos (-6/+1) alrededor del punto de corte (Adams, M. J., et al., 2005, *Molecular Plant Pathology*, 6: 471-487). Esta proteasa también es activa en el procesamiento de una diana artificial introducida entre el marcador reportero de la β -glucuronidasa y la HC-Pro, una posición en la poliproteína donde esta proteasa no corta de manera natural (Carrington, J. C., et al., 1993, *Journal of Virology*, 67: 6995-7000).

El uso de diferentes sitios de inserción a lo largo del genoma de algunos potyvirus ha permitido la expresión de al menos una proteína heteróloga (US5491076A). También se ha llevado a cabo la coexpresión de dos y de hasta tres proteínas a partir de un único vector (Masuta, C., et al., 2000, *Plant Journal*, 23: 539-546; Beauchemin, C., et al., 2005, *Virus Research*, 112: 1-8). Así, un vector basado en el virus A de la patata que expresa tres proteínas heterólogas es infeccioso, estable y se mueve sistémicamente, encapsidándose en un virión coherentemente más largo, teniendo su genoma de RNA un 39,2% mayor que el del virus silvestre (Kelloniemi, J., et al., 2008, *Virus Research*, 135: 282-291). No obstante, las regiones de inserción en estos sistemas se localizan entre las secuencias codificantes de las proteínas virales, lo que supone una limitación en el tamaño de la secuencia heteróloga a insertar.

60 En cuanto a otros vectores diseñados para la expresión simultánea de varias proteínas en cantidades equimolares, existen casetes que comprenden la secuencia codificante para la proteasa viral N1a, múltiples sitios de restricción de endonucleasas donde insertar las secuencias heterólogas de interés, y sitios de corte de esta proteasa que flanquean a la proteasa y a las secuencias de interés (WO9521249A1). Sin embargo, mediante estos vectores únicamente se ha conseguido expresar hasta dos proteínas heterólogas.

65 Por otro lado, es conocido que un mutante defectivo del TEV que contiene una deleción del cistrón completo de la RNA polimerasa viral N1b puede ser complementado en trans y, consecuentemente, replicarse, infectar y moverse sistémicamente en plantas de tabaco transgénicas donde la proteína N1b se suministra a través de la expresión de un

ES 2 370 673 A1

transgén (Li, X. H., J. C. Carrington, 1995, *PNAS*, 92: 457-461). Esta complementación en *trans* también se produce en plantas de benthamiana silvestres que expresan la Nlb viral a partir de otro vector viral compatible como es el PVX (Lu, R., *et al.*, 2003, *EMBO J.*, 22: 5690-5699).

5 El uso de vectores virales para la expresión de productos genéticos heterólogos en plantas está lastrado, sin embargo, por, al menos, dos limitaciones. Una es la cantidad de información genética heteróloga que se puede llegar a expresar a partir de un único vector. La otra es el riesgo de utilizar vectores virales recombinantes con capacidad infecciosa y que, potencialmente, puedan escapar al medio ambiente. Por ello, es necesario el desarrollo de vectores de expresión que permitan coexpresar simultáneamente varias proteínas heterólogas en plantas en cantidades equimolares, los cuales dispongan de un mayor espacio para albergar secuencias exógenas sin que ello afecte a su estabilidad (aspecto de los sistemas de expresión heteróloga que depende en gran medida de la localización y del tamaño del inserto). Asimismo, sería deseable que dichos vectores de expresión permitieran tomar medidas eficaces de contención biológica.

15 Descripción de la invención

La presente invención proporciona un vector de expresión basado en la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus*, preferiblemente del virus del grabado del tabaco, cuyo cistrón de la RNA polimerasa viral Nlb se encuentra delecionado para albergar una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga, preferiblemente para dos y más preferiblemente para tres proteínas heterólogas. Las proteínas heterólogas se expresan, en la célula transfectada con este vector, como parte de la poliproteína viral y se encuentran flanqueadas por secuencias de reconocimiento de la proteasa viral NlaPro, la cual es capaz de liberarlas de la poliproteína completa durante el procesamiento postraduccional. Por tanto, el vector de la invención es útil para la coexpresión de una o de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares en la misma localización subcelular.

25 El vector de expresión diseñado en la invención está desarmado, por lo que puede expresarse de manera controlada en cualquier célula huésped susceptible a la infección por *Potyvirus*, ya que al tener delecionado el cistrón de Nlb es incapaz de infectar plantas silvestres y únicamente infecta, se replica y se mueve sistémicamente en plantas que expresan la polimerasa viral Nlb suministrada en *trans* a través de un transgén u otro vector viral compatible, lo que supone una precisa medida de contención biológica.

Además, el vector de la invención posee un mayor espacio, 1,5 kb (correspondiente al cistrón Nlb delecionado), para la inserción de secuencias heterólogas lo que, como muestran los ejemplos de la presente invención, no afecta a la estabilidad del vector un vez que éste es insertado en la célula huésped. Por tanto, la capacidad de incorporar información genética heteróloga por parte del vector de expresión de la invención se encuentra incrementada. Así, por ejemplo, en el caso de las plantas transgénicas que expresan Nlb, el vector de la invención permite la coexpresión de tres proteínas reporteras o repórters como son las proteínas fluorescentes roja, amarilla y azul en cantidades equimolares y en las mismas células, así como en la misma localización subcelular, de la planta huésped. Estas proteínas, coexpresadas a partir de un casete en el que están flanqueadas por dianas proteolíticas de la NlaPro viral, se liberan muy eficientemente de la proteína viral, no detectándose en las plantas infectadas ningún producto parcialmente procesado, y alcanzan niveles de expresión de alrededor de 10 mg/kg tejido infectado, cantidad superior a las obtenidas con otros vectores basados en potyvirus.

En los ejemplos de la presente invención se muestra que la inserción de un casete de, por ejemplo, 2,3 kb (24% del tamaño del genoma del TEV) en el vector de la invención para la expresión de las tres proteínas reporteras, repercute únicamente en un aumento de tamaño del vector del 8%, mientras que la inserción de tres proteínas heterólogas en otros vectores basados en potyvirus supone un aumento mucho mayor del tamaño de su genoma, lo que sugiere que el vector de la invención puede incorporar mucha más información heteróloga que otros vectores similares.

Además, el vector de expresión de la invención es lo suficientemente estable como para iniciar un segundo ciclo de transfección, por ejemplo, aunque sin limitarnos, una semana después del primer ciclo de transfección, mostrando las mismas propiedades que en el primer ciclo.

Así, este vector permite, por ejemplo, aunque sin limitación alguna, la coexpresión de los componentes polipeptídicos de proteínas heterooligoméricas que necesiten un ensamblaje muy preciso de sus componentes o de las distintas enzimas que componen una ruta metabólica que se desee implementar y que deban actuar coordinadamente.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión, de ahora en adelante “vector de expresión de la invención” o “vector de la invención”, que comprende:

- 60 a. la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus* cuyo cistrón Nlb se encuentra completamente delecionado,
- 65 b. al menos una secuencia reguladora de la expresión génica,
- c. una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga insertada en la región correspondiente al cistrón Nlb delecionado de la secuencia de (a),

ES 2 370 673 A1

- d. una secuencia nucleotídica situada en el extremo 5' de la secuencia de (c) que codifica para una diana de reconocimiento de una proteasa, y
- e. una secuencia nucleotídica situada en el extremo 3' de la secuencia de (c) que codifica para una diana de reconocimiento de una proteasa.

5

Se entiende por “*Potyvirus*” todos aquellos virus que infectan plantas y que pertenecen a la familia *Potyviridae*, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, el virus del grabado del tabaco (TEV), el virus Y de la patata o PVY o el virus A de la patata. El virión de los potyvirus no está envuelto, la nucleocápsida es filamentosa y tiene entre 11 y 20 nm de diámetro. El genoma de todos los potyvirus es ssRNA positivo; y su tamaño oscila entre 9.000 y 12.000 nucleótidos. Su genoma codifica para una poliproteína, la cual está formada, en todas las especies pertenecientes a esta familia, por las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) y las proteínas proteasa P1, factor de transmisión o componente auxiliar HC-Pro, P3, 6K1, proteína de las inclusiones cilíndricas CI, 6K2, VPg, proteína “a” de las inclusiones nucleares Nla-Pro, proteína “b” de las inclusiones nucleares NIb y proteína de la cápsida CP, necesarias para la replicación e infección viral. La secuencia nucleotídica del genoma de un potyvirus es conocida en el estado de la técnica y se encuentra accesible en las bases de datos que recogen información genética, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, el cDNA infeccioso del TEV cuyo número de acceso en el Genbank es DQ986288, o los números de acceso del GenBank FJ643479, FJ643478 o FJ643477. En una realización preferida, la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus* de (a) es la de número de acceso en el Genbank DQ986288.

15

20

En la presente invención, la secuencia nucleotídica del genoma de un potyvirus de (a) tiene delecionada la región correspondiente al cistrón NIb. El cistrón NIb es la región de la secuencia nucleotídica del genoma de un potyvirus que codifica para la RNA polimerasa viral RNA dependiente NIb, que se encuentra entre las regiones codificantes para NlaPro y CP. En una realización preferida, el cistrón NIb es la secuencia nucleotídica que codifica para los aminoácidos 2.280 a 2.791 de la poliproteína ABJ16044, los cuales corresponden a la NIb del TEV. Deleciones en este cistrón se pueden llevar a cabo mediante técnicas de mutagénesis o ingeniería genética conocidas en el estado de la técnica.

25

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el *Potyvirus* es el virus del grabado del tabaco o TEV, cuya secuencia nucleotídica de su genoma fue descrita por primera vez por R. Allison, *et al.* (*Virology*, 154:9-20, 1986).

30

En la presente invención se entiende por “secuencias reguladoras de la expresión génica”, “región reguladora” o “elemento regulador” todas aquellas secuencias nucleotídicas cuya función influye en la traducción o transcripción de los genes. Ejemplos de este tipo de secuencias son, aunque sin limitarnos, reguladores, potenciadores, represores, elementos de respuesta, promotores o terminadores. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la secuencia reguladora de la expresión génica de (b) es un promotor, entendiéndose por “promotor” cualquier secuencia nucleotídica que contenga diferentes dominios de unión a uno o varios factores de transcripción y que determine el lugar donde la polimerasa comienza la transcripción. Ejemplos de promotores son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la caja TATA(A/T)A(A/T) o el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. En una realización más preferida, el promotor de la invención es el 35S del virus del mosaico de la coliflor o CaMV. En otra realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica de (b) es un terminador, entendiéndose por “terminador” cualquier secuencia nucleotídica que determine el final de la transcripción génica. En una realización más preferida, el terminador es el 35S del virus del mosaico de la coliflor o CaMV. Preferiblemente, el vector de la invención comprende al menos dos secuencias reguladoras de la expresión génica, más preferiblemente un promotor y un terminador, y aun más preferiblemente el promotor y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor o CaMV.

35

40

45

En el contexto de la presente invención se entiende por “proteína heteróloga” cualquier proteína que no se exprese de manera natural en un potyvirus wild-type, sino que procede de cualquier otro organismo vivo. La secuencia nucleotídica de (c) se inserta en la región correspondiente al cistrón NIb delecionado de la secuencia de (a), concretamente en los sitios de restricción de endonucleasas compatibles que han debido ser construidos previamente tanto en la secuencia de (a), a ambos extremos 5' y 3' del cistrón NIb, como en los extremos 5' y 3' de la secuencia de (c). Ejemplos de proteínas heterólogas que podrían ser codificadas por la secuencia nucleotídica de (c), y por tanto, que podrían expresarse a partir del vector de la invención, son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, proteínas reporteras o repórters, como GFP (de sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*), mCherry, Venus o mTagBFP (de sus siglas en inglés *Blue Fluorescent Protein*), hormonas, fitohormonas, anticuerpos, antibióticos, antioxidantes, vitaminas, productos fitosanitarios, fertilizantes, enzimas, polipéptidos de proteínas heterooligoméricas que necesiten un ensamblaje muy preciso de sus componentes o distintas enzimas que componen una ruta metabólica que se desee implementar y que deban actuar coordinadamente. En otra realización preferida, la proteína heteróloga codificada por la secuencia nucleotídica de (c) es una proteína repórters seleccionada de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. La SEQ ID NO: 3 corresponde a la proteína mCherry marcada en su extremo N-terminal con la secuencia aminoacídica de la etiqueta FLAG. La SEQ ID NO: 4 corresponde a la proteína Venus marcada en su extremo N-terminal con la secuencia aminoacídica de la etiqueta HA. La SEQ ID NO: 5 corresponde a la proteína mTagBFP marcada en su extremo N-terminal con la secuencia aminoacídica de la etiqueta c-Myc. Estas proteínas repórters se encuentran marcadas con etiquetas para su posterior detección mediante anticuerpos, ya que las etiquetas en las proteínas heterólogas expresadas pueden mejorar su estabilidad y facilitar su purificación.

50

60

65

ES 2 370 673 A1

Se entiende por “proteasa” cualquier enzima, nativa o no nativa de los potyvirus, que sea capaz de fragmentar las proteínas en péptidos de menor tamaño. Ejemplos de proteasas útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitarnos, P1, HC-Pro, NlaPro o Nla. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la proteasa de (d) y/o (e) es NlaPro. Secuencias de reconocimiento de la proteasa NlaPro son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la secuencia de aminoácidos Glu-X-X-Tyr-X-Gln/(Ser o Gly), SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización más preferida, la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro de (d) es SEQ ID NO: 1. En una realización aun más preferida, la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro de (e) es SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica de (c) codifica para al menos dos proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa. En una realización más preferida, la proteasa es NlaPro. En una realización aun más preferida la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro que separa las dos proteínas heterólogas entre sí es SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, las dos proteínas heterólogas codificadas por la secuencia nucleotídica de (c) son dos proteínas repórtier seleccionadas de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En otra realización preferida, la secuencia nucleotídica de (c) codifica para al menos tres proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa. En una realización más preferida, la proteasa es NlaPro. En una realización aun más preferida la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro que separa las tres proteínas heterólogas entre sí es SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, las tres proteínas heterólogas codificadas por la secuencia nucleotídica de (c) son las proteínas repórtier SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. En los ejemplos de la presente invención, el vector de expresión que comprende estas tres proteínas repórtier se denominará TEVΔNlb-CVB.

El vector de la invención puede comprender una secuencia nucleotídica (c) que codifique para más de tres proteínas heterólogas separadas entre sí por secuencias de reconocimiento de una proteasa, preferiblemente de la proteasa NlaPro y más preferiblemente cuya secuencia de reconocimiento sea SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el vector de la invención se construye como se describe en los ejemplos de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula, de ahora en adelante “célula de la invención”, que comprende de forma transitoria o de forma estable:

- a. el vector de la invención, y
- b. una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína Nlb de un *Potyvirus*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula de la invención pertenece a una especie vegetal. Las especies vegetales de las cuales podrían provenir las células de la invención son todas aquellas susceptibles a la infección por un potyvirus, preferiblemente, por el virus del grabado del tabaco, las cuales comprenden, por ejemplo, aunque sin limitarnos, las recogidas en Fauquet, C. M., *et al.*, 2005, *Elsevier/Academic Press*, London o en US5491076A.

El vector de la invención puede transfectarse a una célula mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención, mediante electroporación, microinyección, liposomas o métodos químicos. El método empleado para la transfección del vector de la invención a una célula es, preferiblemente, agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención.

Para que el vector de la invención pueda infectar y replicarse en una célula es necesario que ésta comprenda la secuencia nucleotídica de la polimerasa Nlb de un *Potyvirus*, para poder aportar al vector esta proteína en *trans*. Esta célula puede expresar dicha proteína a partir de un transgén que comprenda la secuencia nucleotídica de la Nlb o bien a partir de un vector compatible con el vector de la invención que comprenda el gen de la Nlb con el que haya sido transfectada la célula. Este vector comprendiendo el gen de la Nlb podría ser, por ejemplo, aunque sin limitarnos, el plásmido pgR107-Nlb, el cual podría transfectarse a la célula mediante, por ejemplo, aunque sin limitarnos, agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo dicho plásmido, mediante electroporación, microinyección, liposomas o métodos químicos. El método empleado en la presente invención para dicha transfección es, preferiblemente, agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo este plásmido.

Otro aspecto de la invención se refiere al polen que comprende la célula de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una planta, de ahora en adelante “planta de la invención”, que comprende la célula de la invención. La planta de la invención podría ser cualquiera susceptible de ser infectada por un potyvirus, preferiblemente, por el virus del grabado del tabaco, las cuales comprenden, por ejemplo, aunque sin limitarnos, las recogidas en Fauquet, C. M., *et al.*, 2005, *Elsevier/Academic Press*, London o en US5491076A. En una realización preferida, la planta de la invención pertenece a la especie *Nicotiana tabacum*, ya que el potyvirus del cual proviene la secuencia nucleotídica de (a) del vector de la invención es, preferiblemente, el TEV.

ES 2 370 673 A1

Otro aspecto de la invención se refiere al germoplasma de la planta de la invención, entendiéndose por “germoplasma” el material genético en cualquiera de sus fórmulas reproductivas, como por ejemplo, sin limitarnos, semillas, esquejes, tubérculos, etc., que se transmite en la reproducción a la descendencia.

5 El vector de la invención es útil para la producción de proteínas heterólogas cuando se transfecta, mediante cualquiera de los métodos de transfección anteriormente descritos, a una célula, a un tejido o a una planta que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para la NIb de un potyvirus, es decir, para la producción de proteínas heterólogas tanto *in vivo* como *in vitro*.

10 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de la invención para la expresión de al menos una proteína heteróloga. El vector de la invención es útil para la expresión de al menos una proteína heteróloga cuando la secuencia nucleotídica de (c) codifica para una proteína heteróloga.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de la invención para la expresión de al menos dos proteínas heterólogas. El vector de la invención es útil para la expresión de al menos dos proteínas heterólogas cuando la secuencia nucleotídica de (c) codifica para dos proteínas heterólogas.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de la invención para la expresión de al menos tres proteínas heterólogas. El vector de la invención es útil para la expresión de al menos tres proteínas heterólogas cuando la secuencia nucleotídica de (c) codifica para tres proteínas heterólogas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de la invención para la expresión de más de tres proteínas heterólogas. El vector de la invención es útil para la expresión de más de tres proteínas heterólogas cuando la secuencia nucleotídica de (c) codifica para más de tres proteínas heterólogas.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención o de la planta de la invención para la producción de al menos una, dos o tres proteínas heterólogas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la obtención de al menos una proteína heteróloga, “primer método de la invención”, que comprende:

- 30
- a. transfectar, de manera simultánea o secuencial, una célula con la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus* y con el vector de expresión de la invención cuya secuencia de (c) codifica para una proteína heteróloga,
 - 35 b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - c. purificar la proteína heteróloga expresada en la célula cultivada en el paso (b).

40 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la obtención de al menos dos proteínas heterólogas, “segundo método de la invención”, que comprende:

- 45
- a. transfectar, de manera simultánea o secuencial, una célula con la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus* y con el vector de expresión de la invención cuya secuencia de (c) codifica para dos proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa,
 - b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - 50 c. purificar las proteínas heterólogas expresadas en la célula cultivada en el paso (b).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la obtención de al menos tres proteínas heterólogas, “tercer método de la invención”, que comprende:

- 55
- a. transfectar una célula que expresa la proteína NIb de un *Potyvirus* con el vector de expresión de la invención cuya secuencia de (c) codifica para tres proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa,
 - b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - 60 c. purificar las proteínas heterólogas expresadas en la célula cultivada en el paso (b).

65 En una realización preferida, la célula del paso (a) del primer, segundo y tercer método de la invención pertenece a una especie vegetal. Las especies vegetales de las cuales podría provenir dicha célula son todas aquellas susceptibles a la infección por un potyvirus, preferiblemente, por el virus del grabado del tabaco, las cuales comprenden, por ejemplo, aunque sin limitarnos, las recogidas en Fauquet, C. M., *et al.*, 2005, *Elsevier/Academic Press*, London o en US5491076A.

La transfección del paso (a) del primer y segundo método de la invención podría llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos de transfección anteriormente descritos, aunque, en una realización preferida, la transfección del paso (a) del primer y segundo método de la invención se realiza mediante la agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención cuya secuencia de (c) codifica para una proteína heteróloga (primer método de la invención) o cuya secuencia de (c) codifica para dos proteínas heterólogas (segundo método de la invención), en una célula que comprende el transgén que codifica para la proteína Nlb de un potyvirus, preferiblemente del TEV (transfección secuencial). En otra realización preferida, la transfección del paso (a) del primer y segundo método de la invención se realiza mediante la coagroinoculación simultánea con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención cuya secuencia de (c) codifica para una proteína heteróloga (primer método de la invención) o cuya secuencia de (c) codifica para dos proteínas heterólogas (segundo método de la invención), y con un vector comprendiendo el gen de la Nlb, preferiblemente con el plásmido pgR107-Nlb (transfección simultánea). En otra realización preferida, la transfección se realiza mediante la coagroinoculación simultánea con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención cuya secuencia de (c) codifica para una proteína heteróloga (primer método de la invención) y con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el plásmido pgR107-Nlb. Como muestran los ejemplos de la presente invención, tanto la transfección simultánea como secuencial en el paso (a) del primer y segundo método de la invención es capaz de provocar la expresión de una (primer método) o de dos (segundo método) proteínas heterólogas.

Cuando la secuencia nucleotídica de (c) del vector de la invención codifica para tres proteínas heterólogas, la transfección a la célula con dicho vector en el paso (a) del tercer método de la invención ha de ser secuencial, es decir, el vector de la invención ha de transfectarse a una célula que ya expresa la proteína Nlb de un potyvirus, ya que la cotransfección con otro vector que comprenda la secuencia nucleotídica de Nlb se ha demostrado ineficaz para la expresión de las tres proteínas. Dicha transfección del paso (a) del tercer método de la invención podría llevarse a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante cualquiera de los métodos de transfección anteriormente descritos aunque, preferiblemente, se realiza mediante la agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens* comprendiendo el vector de la invención cuya secuencia de (c) codifica para tres proteínas heterólogas en una célula que comprende el transgén que codifica para la proteína Nlb de un potyvirus, preferiblemente del TEV (transfección secuencial).

El cultivo de la célula así transfectada se lleva a cabo en el paso (b) del primer, segundo y tercer método de la invención. Dicho cultivo podrá ser *in vitro*, si la célula del paso (a) ha sido aislada de una muestra biológica, o *in vivo* si la célula del paso (a) no ha sido aislada de su tejido, órgano u organismo de origen.

La purificación de la/s proteína/s heteróloga/s en el paso (c) del primer, segundo y tercer método de la invención se puede llevar a cabo por métodos de purificación conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante cromatografía, etc. Las proteínas que se expresan en los métodos de la invención se encuentran, preferiblemente, marcadas con una secuencia aminoacídica en uno de sus extremos de manera que puedan ser detectadas y purificadas fácilmente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra el esquema del vector de expresión defectivo $TEV\Delta Nlb-CVB$. En el clon infeccioso del TEV contenido en el plásmido pGTEV, el cistrón Nlb (rectángulo gris claro) está sustituido por un casete de expresión con cDNAs para expresar las proteínas fluorescentes reporteras etiquetadas FLAG-mCherry, HA-Venus y c-Myc-mTagBFP flanqueados por dianas de procesamiento de la proteasa viral NlaPro. Se indican las posiciones del promotor (P 35S) y terminador (t 35S) 35S del CaMV (rectángulos gris oscuro), las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) del genoma del TEV (líneas negras) y el resto de cistrones del TEV (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Nla-Pro y CP, rectángulos blancos). Los puntos de procesamiento proteolítico en el casete de expresión están indicados con triángulos.

Fig. 2. Muestra las imágenes de fluorescencia en hojas de *N. tabacum* o de *N. benthamiana* inoculadas con virus $TEV-wt$ y virus $TEV\Delta Nlb$. (A) Muestra las imágenes de hojas de *N. tabacum* 35S::Nlb inoculadas con los virus $TEV-wt$, $TEV\Delta Nlb-Cherry$, $TEV\Delta Nlb-Venus$, $TEV\Delta Nlb-Blue$ y $TEV\Delta Nlb-CVB$ tomadas con una lupa de fluorescencia con filtros para detectar la fluorescencia roja, verde y azul. (B) Muestra las imágenes de una hoja de *N. tabacum* 35S::Nlb inoculado con $TEV\Delta Nlb-CVB$ tomadas con microscopio confocal para detectar la fluorescencia roja, verde y azul. (C) Muestra las imágenes de hojas de *N. benthamiana* silvestres coinoculadas con PVX-Nlb y los virus $TEV-wt$, $TEV\Delta Nlb-Cherry$, $TEV\Delta Nlb-Venus$, $TEV\Delta Nlb-Blue$ o $TEV\Delta Nlb-CVB$ tomadas con una lupa de fluorescencia con filtros para detectar la fluorescencia roja, verde y azul.

Fig. 3. Muestra el análisis western de las proteínas heterólogas expresadas en *N. tabacum* 35S::Nlb y *N. benthamiana*/PVX-Nlb mediante los virus defectivos $TEV\Delta Nlb-Cherry$, $TEV\Delta Nlb-Venus$, $TEV\Delta Nlb-Blue$ y $TEV\Delta Nlb-CVB$. Las proteínas se separaron por PAGE-SDS y se analizaron por western con anticuerpos anti-FLAG (A), anti-HA

(B) y anti-c-Myc (C). *N. tabacum* 35S::Nlb (carriles 1 a 5) y *N. benthamiana*/PVX-Nlb (carriles 6 a 10) inoculados con TEV-wt (carriles 1 y 6), TEVΔNlb-Cherry (carriles 2 y 7), TEVΔNlb-Venus (carriles 3 y 8), TEVΔNlb-Blue (carriles 4 y 9) y TEVΔNlb-CVB (carriles 5 y 10). La posición de marcadores de peso molecular de proteínas con su tamaño en kDa se indica a la izquierda de los paneles.

5 Fig. 4. Muestra el diagnóstico del TEV mediante RT-PCR en *N. tabacum silvestre* y 35S::Nlb inoculados con los virus defectivos TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus, TEVΔNlb-Blue y TEVΔNlb-CVB. Los productos de amplificación por RT-PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa que se tiñó con bromuro de etidio. *N. tabacum silvestre* (carriles 1 a 6) y *N. tabacum* 35S::Nlb (carriles 7 a 12) no inoculados (carriles 1 y 7) o inoculados con TEV-wt (carriles 2 y 8), TEVΔNlb-Cherry (carriles 3 y 9), TEVΔNlb-Venus (carriles 4 y 10), TEVΔNlb-Blue (carriles 5 y 11) y TEVΔNlb-CVB (carriles 6 y 12). Carril 13, marcador de DNA, escalera de 500 pb, con el tamaño de alguno de sus componentes en pb indicada a la derecha.

15 Fig. 5. Muestra el análisis de la expresión de la proteína heteróloga FLAG-mCherry expresada en *N. tabacum* 35S::Nlb y *N. benthamiana*/PVX-Nlb mediante los virus defectivos TEVΔNlb-Cherry y TEVΔNlb-CVB. Las proteínas se separaron por PAGE-SDS en geles duplicados, uno de los cuales se tiñó con azul Coomassie (A) y el otro se analizó por western con un anticuerpo anti-FLAG (B). Carriles 1 a 6, patrón de FLAG-mCherry purificado a partir de *E. coli*. Carril 7, marcador de proteínas con su peso molecular en kDa indicado a la derecha de los paneles. Carriles 8 y 9, *N. tabacum* 35S::Nlb inoculadas con TEVΔNlb-CVB y TEVΔNlb-Cherry, respectivamente. Carril 10, *N. benthamiana*/PVX-Nlb inoculada con TEVΔNlb-Cherry.

25 Fig. 6. Muestra el análisis de la integridad del casete de expresión de los virus defectivos TEVΔNlb por RT-PCR a una semana postinoculación. Los productos de amplificación por RT-PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa que se tiñó con bromuro de etidio. Carril 1, control sin molde de la RT-PCR. *N. tabacum* 35S::Nlb (carriles 2 a 7) y *N. benthamiana*/PVX-Nlb (carriles 8 a 13) no inoculados (carriles 2 y 8) o inoculados con TEV-wt (carriles 3 y 9), TEVΔNlb-Cherry (carriles 4 y 10), TEVΔNlb-Venus (carriles 5 y 11), TEVΔNlb-Blue (carriles 6 y 12) y TEVΔNlb-CVB (carriles 7 y 13). Carril 14, marcador de DNA, escalera de 500 pb, con el tamaño de alguno de sus componentes en pb indicado a la derecha.

30 Fig. 7. Muestra las imágenes de hojas de *N. tabacum* 35S::Nlb inoculadas con jugo de plantas infectadas con TEV-wt (A), TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus y TEVΔNlb-Blue (B) y TEVΔNlb-CVB (C), tomadas con una lupa de fluorescencia con filtros para detectar la fluorescencia roja, verde y azul. Tres plantas (1, 2 y 3) se inocularon con jugo de plantas infectadas una semana postinoculación y se fotografiaron una semana después de la segunda inoculación. En el control con TEV-wt (A) solo se muestra el resultado de una de las tres réplicas.

35

Ejemplos

40 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del vector de expresión de la invención para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

45

Ejemplo 1

50 *Construcción de un casete de expresión de tres proteínas fluorescentes roja, amarilla y azul sustituyendo el cistrón de Nlb en el cDNA del TEV*

55 Se diseñó un casete para la coexpresión de tres proteínas fluorescentes reporteras y se insertó en el cDNA infeccioso del TEV contenido en el plásmido pGTEV sustituyendo el cistrón de Nlb. pGTEV es un plásmido binario estable con un cDNA infeccioso del TEV flanqueado por el promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor que permite la agroinoculación de forma muy eficiente de plantas de tabaco (Bedoya and Daròs, 2010, *Virus Research*, doi:10.1016/j.virusres.2010.02.004). El casete de expresión se diseñó de manera que las distintas proteínas a expresar estuvieran flanqueadas por una secuencia de reconocimiento de la proteasa viral NlaPro (Fig. 1). Concretamente, se eligió la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 y la secuencia aminoacídica -8/+3 alrededor del sitio de procesamiento Nlb/CP en la poliproteína del TEV (SEQ ID NO: 2). En cualquier caso, en las secuencias nucleotídicas correspondientes a las dianas proteolíticas artificiales se introdujeron mutaciones silenciosas para evitar repeticiones de secuencia extensas que pudieran facilitar la recombinación homóloga durante la replicación del RNA viral.

65 Como proteínas reporteras para estudiar la coexpresión se eligieron la proteína fluorescente roja mCherry, la proteína fluorescente amarilla Venus y la proteína fluorescente azul mTagBFP. Estas tres proteínas fluorescentes poseen espectros de excitación y emisión que permiten su detección sin interferencia. Además, cada una de ellas proviene de un linaje de proteínas fluorescentes distinto por lo que no son homólogas entre sí. Únicamente existe cierta identidad de secuencia en los extremos 5' y 3' de los cDNAs de mCherry y Venus que se destruyó, de nuevo para evitar recom-

ES 2 370 673 A1

binaciones indeseadas durante la replicación del virus, introduciendo cuatro mutaciones silenciosas en el cDNA de mCherry. Las proteínas se expresaron incluyendo etiquetas amino terminales que permitieran su detección inequívoca mediante anticuerpos específicos: FLAG-Cherry (SEQ ID NO: 3), HA-Venus (SEQ ID NO: 4) y c-Myc-mTagBFP (SEQ ID NO: 5).

5

1.1. Construcción de plásmidos

El plásmido pGTEV contenía un cDNA infeccioso del TEV (número de acceso Genbank DQ986288) flanqueado por el promotor y terminador 35S del CaMV (Bedoya and Daròs, 2010, *Virus Research*, doi:10.1016/j.virusres.2010.02.004). El plásmido pTEV89 contenía un fragmento de cDNA del TEV-DQ986288 (desde la posición 6.506 a la 9.059) insertado en el sitio *Sma*I de pBluescript II KS + (número acceso Genbank X52327). Este fragmento de cDNA que incluía el cistrón completo de Nlb, estaba flanqueado por los sitios de restricción *Eco*81I y *Bln*I que son únicos en pGTEV. El plásmido pGR107 (número de acceso Genbank AY297842) contenía un clon infeccioso del PVX que incluía un promotor duplicado de la proteína de cubierta delante de un pequeño polylinker. El plásmido pmCherry contenía el cDNA de la proteína fluorescente roja mCherry (número de acceso Genbank AY678264). El plásmido pDH51-GW-YFP (número de acceso Genbank AM773752) contenía el cDNA de la proteína fluorescente amarilla Venus. El plásmido pmTagBFP contenía el cDNA de la proteína fluorescente azul mTagBFP tal y como se presenta en el plásmido pTagBFP-N (Evrogen) pero con la mutación silenciosa G258A en el cDNA de mTagBFP para destruir un sitio *Eco*81I.

Las amplificaciones de PCR realizadas para construir plásmidos se realizaron en 20 μ l con 0,4 U de la DNA polimerasa Phusion de alta fidelidad de copia (Finnzymes) en tampón HF (Finnzymes), 3% DMSO, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M cada cebador y 10 ng de DNA molde. Las reacciones se incubaron 30 s a 98°C seguidas de 30 ciclos de 10 s a 98°C, 30 s a 55°C y un tiempo de extensión variable según la longitud del producto (a razón de 15 s/kb) a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Las construcciones se transformaron por electroporación en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . El cDNA de mCherry incluyendo una etiqueta FLAG amino terminal se amplificó a partir de pmCherry con los cebadores PI (SEQ ID NO: 6, 5'-GGCGGGTCTCGGAAGGACTACAAGGACGACGATGACAAAATGGTTAGCAAAGGCGAGGAG-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, etiqueta FLAG negrita, mutaciones silenciosas en mCherry subrayadas) y PII (SEQ ID NO: 7, 5'-GGCGGGTCTCGTCGTCCTTATACAGCTCATCCATGC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, mutaciones silenciosas en mCherry subrayadas). El cDNA de Venus incluyendo una etiqueta HA amino terminal se amplificó a partir de pDH51-GW-YFP con los cebadores PIN (SEQ ID NO: 8, 5'-GGCGGGTCTCGGAAGTACCCATACGATGTTCCA GATTACGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, etiqueta HA negrita) y PIV (SEQ ID NO: 9, 5'-GGCGGGTCTCGTCGTCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva). El cDNA de mTagBFP incluyendo una etiqueta c-Myc amino terminal se amplificó a partir de pmTagBFP con los cebadores PV (SEQ ID NO: 10, 5'-GGCGGGTCTCGGAAGGAACAAAACCTTATTTCTGAAGAAGATCTGATGAGCGAGCTGATTAAGGAG-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, etiqueta c-Myc negrita) y PVI (SEQ ID NO: 11, 5'-GGCGGGTCTCGTCGTTAATGCTGTGCCCCAGTTTG-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva). Estos tres cDNAs digeridos con *Eco*31I (Fermentas) se ligaron al producto de PCR resultado de la amplificación de pTEV89 con los cebadores PVII (SEQ ID NO: 12, 5'-GGCGGGTCTCGCTTCTCCCCTTGCGAGTACACC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva) y PVIII (SEQ ID NO: 13, 5'-GGCGGGTCTCGACGACTGAGAATCTTTATTTTC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva), también digerido con *Eco*31I. En los plásmidos resultantes pTEV89 Δ Nlb-Cherry, pTEV89 Δ Nlb-Venus y pTEV89 Δ Nlb-Blue, cada una de los cDNAs etiquetados de las proteínas fluorescentes FLAG-mCherry, HA-Venus y c-Myc-mTagBFP, respectivamente, sustituían la mayor parte del cistrón de Nlb quedando flanqueados por las dianas de proteólisis NlaPro naturales NlaPro/Nlb y Nlb/CP.

Los tres cDNAs de las proteínas fluorescentes con sus correspondientes etiquetas se volvieron a amplificar en una nueva versión para construir el casete de expresión de las tres proteínas. El cDNA de FLAG-mCherry se amplificó a partir de pTEV89 Δ Nlb-Cherry con los cebadores PI y PIX (SEQ ID NO: 14, 5'-GGCGGGTCTCGAGTGCCGCTTTGGAAGTACAAGTTTTTCAGTCGTCTTATACAGCTCATCCATGC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, diana artificial de proteólisis NlaPro negrita, mutaciones silenciosas en mCherry subrayadas). El cDNA de HA-Venus se amplificó a partir de pTEV89 Δ Nlb-Venus con los cebadores PX (SEQ ID NO: 15, 5'-GGCGGGTCTCGCACTTACCCATACGATGTTCCAGATTAC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, parte de la etiqueta HA en negrita) y PXI (SEQ ID NO: 16, 5'-GGCGGGTCTCGTGTA CTTGAT TGAAGTAGAGGTTCTCTGTAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, diana artificial de proteólisis NlaPro negrita). El cDNA de c-Myc-mTagBFP se amplificó a partir de pTEV89 Δ Nlb-Blue con los cebadores PXII (SEQ ID NO: 17, 5'-GGCGGGTCTCGTACAGAACAAAACCTTATTTCTGAAG-3', sitio de reconocimiento *Eco*31I subrayado y sitio de corte cursiva, parte de la etiqueta c-Myc en negrita) y PVI. Los tres cDNAs se digirieron con *Eco*31I y se ligaron al producto de amplificación de pTEV89 con los cebadores PVII y PVI1 también digerido con *Eco*31I, descrito anteriormente. El plásmido resultante del ensamblaje de los cuatro fragmentos de restricción se nombró pTEV89 Δ Nlb-CVB y contenía los cDNAs de FLAG-mCherry, HA-Venus y c-Myc-mTagBFP, separados entre ellos por dos sitios artificiales NlaPro, sustituyendo la mayor parte del cistrón de Nlb flanqueados por las dianas de proteólisis NlaPro naturales NlaPro/Nlb y Nlb/CP.

65

ES 2 370 673 A1

Finalmente, los fragmentos de restricción *Eco81I-BlnI* de cada uno de los plásmidos pTEV89ΔNlb-Cherry, pTEV89ΔNlb-Venus, pTEV89ΔNlb-Blue y pTEV89ΔNlb-CVB, que contenían el correspondiente casete de expresión, se intercambiaron por el fragmento de cDNA *Eco81I-BlnI* de pGTEV para construir los vectores de expresión pGTEVΔNlb-Cherry, pGTEVΔNlb-Venus, pGTEVΔNlb-Blue y pGTEVΔNlb-CVB, respectivamente.

El plásmido pgR107-Nlb se construyó insertando un cDNA de la Nlb del TEV, incluyendo una ATG amino terminal y un codón de parada UGA carboxi terminal, amplificado a partir de pGTEV con los cebadores PXIII (SEQ ID NO: 18, 5'-GGCGATCGATGGGGGAGAAGAGGAAATGGGTC-3', ATG amino terminal negrita, cebador fosforilado en 5') y PXIV (SEQ ID NO: 19, 5'-GGCGGGTCTCGTCCGATCACTGAAAATAAAGATTCTCAGTC-3', sitio de reconocimiento *Eco31I* subrayado y de corte cursiva, codón de parada UGA en negrita) y digerido en uno de sus extremos con *Eco31I* en el plásmido pgR107 abierto con *SmaI-SallI*. El plásmido resultante se nombró pgR107-Nlb y contenía el cDNA de la Nlb del TEV flanqueada por un codón de inicio (ATG) y uno de parada (UGA) tras el promotor de la CP del PVX que está duplicado en el plásmido pgR107.

Ejemplo 2

Expresión de las proteínas fluorescentes roja, amarilla y azul a partir de un vector defectivo TEVΔNlb en plantas en las que la proteína Nlb se suplementa en trans

Para estudiar la expresión de las tres proteínas fluorescentes reporteras a partir del vector defectivo TEVΔNlb se eligieron dos casos experimentales distintos en los que la proteína Nlb del TEV se suplementó en *trans*. En primer lugar se utilizaron plantas de tabaco transgénicas que expresaban Nlb bajo el control del promotor y terminador 35S del CaMV y, en segundo lugar, plantas silvestres de benthamiana coinoculadas con un segundo virus compatible, como es el PVX, que expresaba Nlb a través de un promotor duplicado de la proteína de cubierta. En ambos casos, la proteína Nlb suplementada fue exactamente la Nlb del TEV (aminoácidos 2.280 a 2.791 de la poliproteína ABJ16044) más una Met amino terminal.

2.1. Inoculación de plantas

Plantas de tabaco silvestres (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xhanti nc), plantas transgénicas de este mismo cultivar que expresan la proteína Nlb del TEV incluyendo una Met amino terminal y plantas de benthamiana silvestres (*Nicotiana benthamiana* Domin) de, aproximadamente, 6 semanas de edad se agroinocularon en las dos hojas expandidas más apicales (dos halos de infiltración por hoja) y se cultivaron en una cámara de crecimiento en condiciones de 16 h día a 25° y 8 h noche 23°C. La agroinoculación se llevó a cabo con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 que contenían el plásmido auxiliar pCLEAN-S48 y alguno de los plásmidos pGTEV, pGTEVΔNlb-Cherry, pGTEVΔNlb-Venus, pGTEVΔNlb-Blue, pGTEVΔNlb-CVB o pgR107-Nlb, ajustados a una DO (600 nm) de, aproximadamente, 0,5 e inducidos durante 2 h a 28°C con 150 μM acetosiringona en tampón 10 mM MES-NaOH, pH 5.6, 10 mM MgCl₂. En algunos casos se agroinocularon mezclas 1:1 de algunos de los cultivos.

Las plantas también se inocularon mecánicamente con homogenizados de tejido infectado. Para ello, 50 mg de tejido congelado en un tubo Eppendorf de 2 ml se trituraron en presencia de una bola de acero inoxidable de 4 mm de diámetro durante 1 min a una frecuencia de 30 s⁻¹ con un molino Retsch MM300 y se añadió 1 ml (20 volúmenes) de tampón TI (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 1% PVP-10, 1% PEG-6000, 10 mM 2-mercaptoetanol). En las dos hojas expandidas más apicales de la planta se depositó una gota a cada lado de cada una de las hojas de 10 μl 10% Carborundum en TI y se inocularon mecánicamente con un bastoncillo con algodón empapado en extracto.

Por tanto, las plantas de tabaco transgénicas que expresaban Nlb se agroinocularon con cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 conteniendo el plásmido auxiliar pCLEAN-S48, transformados con el plásmido pGTEVΔNlb-CVB. Como controles, también se agroinocularon plantas con *A. tumefaciens* transformados con los plásmidos pGTEV (virus silvestre), pGTEVΔNlb-Cherry, pGTEVΔNlb-Venus y pGTEVΔNlb-Blue. A los 4 días postinoculación (dpi), en las plantas inoculadas con el virus silvestre (TEV-wt) y los virus defectivos que expresaban una sola proteína fluorescente (TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus y TEVΔNlb-Blue) aparecieron los síntomas de grabado del TEV. Estos mismos síntomas, pero más suaves, también aparecieron con unos días de retraso en las plantas inoculadas con el virus defectivo que expresa las tres proteínas fluorescentes al mismo tiempo (TEVΔNlb-CVB). En todos los casos, los síntomas aparecieron en una hoja por encima de las dos agroinoculadas pero, en breve, se extendieron a toda la parte apical de la planta. A distintos dpi se recolectaron hojas y se observaron a la lupa de fluorescencia detectándose fuertes señales de fluorescencia. En general, la fluorescencia siempre se detectó asociada a las partes sintomáticas de la planta infectada. En las hojas sintomáticas de plantas infectadas por el TEV-wt no se detectó ninguna fluorescencia atribuible a las proteínas reporteras, en las de plantas infectadas por TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus y TEVΔNlb-Blue se detectó, exclusivamente, fluorescencia roja, verde (en lugar de amarilla debido al filtro utilizado en la lupa) y azul, respectivamente, y en las de plantas infectadas por TEVΔNlb-CVB se detectaron las tres señales de fluorescencia al mismo tiempo, perfectamente colocalizadas en la hoja (Fig. 2A). Un análisis más preciso mediante microscopio confocal de este último tejido mostró también una exquisita colocalización de las tres señales de fluorescencia a nivel subcelular por todo el citoplasma y núcleo de las células del tejido sintomático (Fig. 2B).

Plantas de benthamiana silvestres se coagroinocularon con una mezcla 1:1 de dos cultivos de *A. tumefaciens* C58C1 (conteniendo el plásmido auxiliar pCLEAN-S48) transformados, uno con el plásmido pgR107-Nlb, que induce una infección por una versión recombinante del PVX que expresa la proteína Nlb del TEV (PVX-Nlb), y el otro con pGTEVΔNlb-CVB. En el experimento se incluyeron controles de agroinoculación solo con PVX-Nlb y de coagroinoculación entre PVX-Nlb y TEV-wt, TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus y TEVΔNlb-Blue. A los 4 dpi aparecieron síntomas de enrollamiento en las hojas apicales en las plantas coagroinoculadas con PVX-Nlb/TEV-wt. Con unos días de retraso, también se observaron unos síntomas mucho más suaves, consistentes en manchas cloróticas, en las plantas coinoculadas con PVX-Nlb y TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus o TEVΔNlb-Blue. Las plantas inoculadas con PVX-Nlb solo y la mezcla PVX-Nlb/TEVΔNlb-CVB experimentaron un mayor retraso en mostrar unos síntomas que todavía fueron más suaves. 14 dpi las benthamianas inoculadas con PVX-Nlb/TEV-wt colapsaron. El resto de las plantas se mantuvieron vivas indefinidamente con síntomas suaves. De nuevo se recolectó tejido sintomático a diferentes dpi y se analizó la expresión de las proteínas fluorescentes mediante observación con la lupa de fluorescencia. Los resultados fueron, en parte, similares al caso de los tabacos transgénicos. En las hojas de plantas inoculadas con PVX-Nlb/TEV-wt no se detectó fluorescencia, en las hojas inoculadas con PVX-Nlb/TEVΔNlb-Cherry, PVX-Nlb/TEVΔNlb-Venus y PVX-Nlb/TEVΔNlb-Blue se detectaron fuertes señales de fluorescencia roja, verde y azul, respectivamente (Fig. 2C). Sin embargo, nunca se detectó fluorescencia en las hojas de plantas coinoculadas con PVX-Nlb/TEVΔNlb-CVB (Fig. 2C).

En su conjunto, los resultados anteriores demuestran que una versión recombinante del TEV que es defectiva en el cistron de Nlb por tenerlo sustituido por un casete para la coexpresión de proteínas reporteras, infecta y se mueve sistémicamente en plantas en las que la proteína viral Nlb se complementa en *trans*. Sin embargo, el sistema de complementación basado en plantas de tabaco transgénicas es más eficiente que el de benthamianas coinfectadas con otro vector viral, como es PVX-Nlb, puesto que en este último la expresión de una proteína heteróloga única es efectiva pero no de tres al mismo tiempo.

Ejemplo 3

Procesamiento de las proteínas fluorescentes roja, amarilla y azul a partir de la poliproteína de TEVΔNlb-CVB

A continuación se investigó si las proteínas fluorescentes reporteras se liberaban eficientemente de la poliproteína del TEVΔNlb-CVB durante el proceso de infección. Para ello se recolectó tejido sintomático, tanto de tabacos transgénicos infectados por TEVΔNlb-CVB, como de benthamianas silvestres coinfectadas por PVX-Nlb/TEVΔNlb-CVB. En el análisis se incluyeron los controles correspondientes a tabacos transgénicos infectados por TEV-wt, TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus y TEVΔNlb-Blue y a benthamianas silvestres coinfectadas por PVX-Nlb/TEV-wt, TEVΔNlb-Cherry, TEVΔNlb-Venus o TEVΔNlb-Blue. Se extrajeron proteínas totales de hojas sintomáticas a distintos dpi, se separaron por PAGE-SDS y se detectaron las proteínas fluorescentes roja (FLAG-mCherry) con un anticuerpo anti-FLAG, amarilla (HA-Venus) con un anticuerpo anti-HA y azul (c-Myc-mTagBFP) con un anticuerpo anti-c-Myc.

3.1 Análisis de las proteínas fluorescentes

Las proteínas fluorescentes en los tejidos infectados se detectaron mediante observación con una lupa de fluorescencia Leica MZ 16 F utilizando los filtros DSR, GFP2 y V (Leica). Las fotos se tomaron con tiempos de exposición de 10,1 ms en campo claro y 5,1 s en fluorescencia. También se analizaron secciones del tejido montadas con Moviol con un microscopio confocal Leica TCS SP5 mediante una lente HCX PL APO 83X/1.4 oil utilizando láseres de excitación de 405, 514 y 630 nm y ventanas de detección de 420-470, 520-550 y 600-670 nm, respectivamente. Finalmente, las proteínas fluorescentes también se detectaron mediante análisis western con anticuerpos específicos para sus correspondientes etiquetas. Para ello, 0,1 g de tejido congelado se trituró en un molino como se indica anteriormente y se añadieron 300 μl (3 volúmenes) de tampón TEW (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glicerol, 0,01% azul bromofenol), se agitó con vortex y se incubó 5 min a 98°C. El extracto se volvió a agitar con vortex y se clarificó centrifugando 15 min. Los sobrenadantes (20 μl ó 10 μl, equivalentes a aproximadamente 6,7 ó 3,3 mg de tejido, respectivamente) se separaron por PAGE-SDS en geles discontinuos, con un gel de apilamiento 5% poliacrilamida y un gel de resolución 12,5% poliacrilamida conteniendo ambos 0,05% SDS. Las proteínas se electrotransferieron a membranas de PVDF (GE Healthcare) que se bloquearon durante 1 h en 5% leche desnatada en tampón WB (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 154 mM NaCl, 0,1% Nonidet P40). La incubación con los anticuerpos se realizó toda la noche a temperatura ambiente con diluciones 1:10.000 de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-DYKDDDDK-tag-HRP (Genscript), anti-HA 12CA5 (Roche) y anti-c-Myc-HRP (Genscript) en 5% leche desnatada en WB. En el caso del anticuerpo anti-HA, se lavaron las membranas con tampón WB y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de oveja anti-ratón-IgG-HRP (GE Healthcare) a dilución 1:10.000 en 5% leche desnatada en WB. Finalmente, todas las membranas se lavaron extensamente con tampón WB y se detectó la peroxidada de rábano (HRP) mediante quimioluminiscencia con el *ECL plus western blotting detection system* (GE Healthcare).

No se detectó ninguna señal en los tejidos correspondientes al TEV-wt (Fig. 3A, B y C, carriles 1 y 6). FLAG-mCherry se detectó en su forma madura procesada de la poliproteína en los tabacos transgénicos inoculados con TEVΔNlb-Cherry (Fig. 3A, carril 2), con TEVΔNlb-CVB (Fig. 3A, carril 5) y las benthamianas coinoculadas con PVX-Nlb/TEVΔNlb-Cherry (Fig. 3A, carril 7). Igualmente, HA-Venus se detectó, exclusivamente, en su forma proce-

sada de la poliproteína en los tabacos transgénicos inoculados con TEV Δ Nlb-Venus (Fig. 3B, carril 3), con TEV Δ Nlb-CVB (Fig. 3B, carril 5) y las benthamianas coinoculadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-Venus (Fig. 3B, carril 8). Por su parte, c-Myc-mTagBFP también se detectó, exclusivamente, en su forma procesada en los tabacos transgénicos inoculados con TEV Δ Nlb-Blue (Fig. 3C, carril 4), con TEV Δ Nlb-CVB (Fig. 3C, carril 5) y las benthamianas coinoculadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-Blue (Fig. 3C, carril 9). En concordancia con las observaciones a la lupa de fluorescencia, en las benthamianas coinoculadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-CVB no se detectó ninguna señal en el análisis western (Fig. 3A, B y C, carril 10). Estos resultados demuestran la eficiente liberación de las proteínas heterólogas a partir de la poliproteína de los virus defectivos TEV Δ Nlb.

Ejemplo 4

Infectividad del vector TEV Δ Nlb-CVB

Para confirmar que el virus defectivo TEV Δ Nlb-CVB es incapaz de replicarse en plantas en las que la actividad Nlb de TEV no se suplementa en *trans*, se agroinocularon plantas de tabaco silvestres y transgénicas con los cultivos de agrobacterium descritos anteriormente. Nunca se observó ningún síntoma de grabado en las plantas silvestres inoculadas con TEV Δ Nlb-CVB, así como con las inoculadas con TEV Δ Nlb-Cherry, TEV Δ Nlb-Venus y TEV Δ Nlb-Blue. Un mes postinoculación se tomó tejido de tres plantas inoculadas con cada uno de los inóculos y se diagnosticó la presencia del TEV mediante amplificación RT-PCR del cistrón de la proteína de cubierta y análisis por electroforesis en un gel de agarosa.

4.1. *Análisis del RNA viral por RT-PCR*

A partir de 50 mg de tejido congelado triturado con el molino se purificó RNA total mediante columnas de gel de sílice que se eluyeron en 10 μ l. Alícuotas de 1 μ l del RNA se sometieron a retrotranscripción en 10 μ l con 50 U de transcriptasa inversa M-MuLV (Revertaid, Fermentas), 10 U inhibidor RNasa (Fermentas), 0,1 mM dNTPs y 5 pmol cebador PXV (SEQ ID NO: 20, 5'-CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC-3, complementario a las posiciones 9.471-9.495 de TEV-DQ986288) en 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT durante 45 min a 42°C, 10 min a 50°C y 5 min a 60°C. La mezcla RNA y cebador en agua fue inicialmente desnaturizada durante 1,5 min a 98°C antes de añadir el resto de reactivos. Para diagnosticar la presencia del TEV en el tejido inoculado, alícuotas de 1 μ l de las reacciones de retrotranscripción anteriores se utilizaron como molde en reacciones de PCR en 20 μ l con 1 U de la DNA polimerasa de *Thermus thermophilus*, 1 μ M de cada cebador PXVI (SEQ ID NO: 21, 5'-CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC-3, homólogo a las posiciones 8.518-8.542 de TEV-DQ986288) y PXVII (SEQ ID NO: 22, 5'-CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC-3, complementario a las posiciones 9.289-9.306 de TEV-DQ986288) 0.2 mM dNTPs en tampón 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄. Las reacciones se incubaron 2 min a 94°C seguidas de 30 ciclos de 40 s a 94°C, 30 s a 55°C y 3 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Para analizar la integridad del casete de expresión en las plantas infectadas las amplificaciones por RT-PCR se realizaron exactamente igual pero utilizando en la PCR los cebadores PXVIII (SEQ ID NO: 23, 5'-CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC-3, homólogo a las posiciones 6.506-6.530 de TEV-DQ986288) y PXIX (SEQ ID NO: 24, 5'-CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC-3, complementario a las posiciones 8.500-8.526 de TEV-DQ986288). En ambos casos, los productos de PCR se separaron en geles de agarosa 1% en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7.2) y se tiñeron con bromuro de etidio.

En la figura 4 se muestra el resultado obtenido con una planta por cada tratamiento, pero las tres réplicas dieron exactamente el mismo resultado. Se amplificó un cDNA específico del TEV de 790 pb en las plantas de tabaco silvestres inoculadas con el TEV-wt y no en las inoculadas con los virus defectivos Δ Nlb (Fig. 4, comparar carril 2 con 3 a 7). En las plantas de tabaco transgénicas que expresan Nlb se amplificó el producto de 790 pb a partir de todas las plantas inoculadas (Fig. 4, carriles 8 a 12). Estos resultados corroboran la incapacidad de los virus defectivos en infectar plantas en las que no se suministra la actividad Nlb viral.

Ejemplo 5

Nivel de expresión de las proteínas recombinantes

Para determinar la cantidad de proteína heteróloga que se producía en el tejido infectado por TEV Δ Nlb-CVB, la proteína FLAG-Cherry en su forma tal y como se liberó de la poliproteína de TEV Δ Nlb-CVB más una Met amino terminal y una cola Leu-Glu-His6 carboxi terminal se expresó en *Escherichia coli* y se purificó mediante cromatografía en una columna de Ni-sefariosa en condiciones desnaturizantes. La proteína purificada se analizó por PAGE-SDS y tinción con azul Coomassie y se cuantificó por comparación con un patrón de seroalbúmina bovina de concentración conocida. La preparación, una vez cuantificada, se utilizó como patrón para determinar la cantidad de proteína expresada en el tejido sintomático de tabacos transgénicos infectados con TEV Δ Nlb-CVB y TEV Δ Nlb-Cherry y de benthamianas silvestres infectadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-Cherry. Para ello, preparaciones de proteínas correspondientes a estos tejidos a distintos dpi se separaron junto a diluciones del patrón por PAGE-SDS y se detectaron por tinción con azul Coomassie (Fig. 5A) y análisis western con el anticuerpo anti-FLAG (Fig. 5B). En la electroforesis se separaron cantidades conocidas de la proteína patrón purificada a partir de *E. coli* (Fig 5, carriles 1 a 6) y las

proteínas totales purificadas a partir de 3,3 mg de tejido sintomático a 9 dpi de tabacos transgénicos infectados con TEV Δ Nlb-CVB (Fig. 5, carril 8) y TEV Δ Nlb-Cherry (Fig. 5, carril 9) y de benthamianas silvestres infectadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-Cherry (Fig. 5, carril 10). La cuantificación de la señal de quimioluminiscencia en el análisis western permitió estimar la acumulación de alrededor de 8, 17 y 20 μ g de FLAG-Cherry por cada gramo de tejido sintomático de tabaco transgénico infectado por TEV Δ Nlb-CVB (Fig. 5B, carril 8) y TEV Δ Nlb-Cherry (Fig. 5B, carril 9) y de benthamianas silvestres infectadas por PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-Cherry (Fig. 5B, carril 10), respectivamente.

Ejemplo 6

Estabilidad del vector TEV Δ Nlb-CVB

Para estudiar la estabilidad de los distintos TEV Δ Nlb recombinantes, al final de un primer ciclo de infección de 1 semana, tanto en plantas de tabaco transgénicas como en benthamianas silvestres coinoculadas con PVX-Nlb se amplificó el casete de expresión por RT-PCR y se analizó el producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En los controles sanos no se detectó la amplificación de ningún DNA (Fig. 6, carriles 2 y 8). En los controles inoculados con TEV-wt se amplificó un DNA coherente con las 2.021 pb que corresponden al TEV-wt (Fig. 6, carriles 3 y 9). En las plantas inoculadas con los virus defectivos que expresan una única proteína TEV Δ Nlb-Cherry, TEV Δ Nlb-Venus y TEV Δ Nlb-Blue se amplificaron productos de alrededor de 1.250 pb consistentes con el casete de expresión correspondiente (Fig. 6, carriles 4 a 6 y 10 a 12). Finalmente, en los tabacos transgénicos inoculados con TEV Δ Nlb-CVB se amplificó un conjunto de productos, el mayor de los cuales, concuerda con el producto de 2.789 pb que se esperaría en el casete con las tres proteínas heterólogas (Fig. 6, carril 7). En las benthamianas silvestres coinoculadas con PVX-Nlb/TEV Δ Nlb-CVB no se obtuvo ningún producto de amplificación (Fig. 6, carril 13).

Por otro lado, a partir de tejido sintomático de tabacos transgénicos, también, 1 semana postinoculación en los que se detectó por observación con la lupa de fluorescencia la expresión de las correspondientes proteínas reporteras, se obtuvo un homogenizado y se inocularon mecánicamente otras tres plantas. A partir de 4 dpi estas plantas empezaron a mostrar los síntomas característicos.

La observación a la lupa de fluorescencia 1 semana postinoculación confirmó la transmisión de los virus defectivos TEV Δ Nlb-Cherry, TEV Δ Nlb-Venus, TEV Δ Nlb-Blue y TEV Δ Nlb-CVB con sus propiedades intactas de expresión de las correspondientes proteínas fluorescentes heterólogas (Fig. 7).

Estos resultados muestran que los vectores defectivos que expresan una única proteína heteróloga son estables y que, tras un ciclo de infección, el casete se amplifica intacto por RT-PCR y el virus recombinante se puede transmitir a otras plantas. Sin embargo, el vector defectivo que expresa las tres proteínas, TEV Δ Nlb-CVB, experimenta recombinaciones en el casete de expresión como demuestra la amplificación de varios productos de RT-PCR. Sin embargo, puesto que la mayoría de estos recombinantes no deben ser viables, al inocular un segundo lote de plantas con un extracto de la primera planta agroinoculada todavía se expresan adecuadamente las tres proteínas fluorescentes reporteras.

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión que comprende:

- 5 a. la secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus* cuyo cistrón Nlb se encuentra completamente dele-
cionado,
- b. al menos una secuencia reguladora de la expresión génica,
- 10 c. una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga insertada en la región
correspondiente al cistrón Nlb delecionado de la secuencia de (a),
- d. una secuencia nucleotídica situada en el extremo 5' de la secuencia de (c) que codifica para una diana de
15 reconocimiento de una proteasa, y
- e. una secuencia nucleotídica situada en el extremo 3' de la secuencia de (c) que codifica para una diana de
reconocimiento de una proteasa.

20 2. Vector de expresión según la reivindicación 1 donde el *Potyvirus* es el virus del grabado del tabaco.

3. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la secuencia reguladora de la expresión
génica de (b) es un promotor.

25 4. Vector de expresión según la reivindicación 3 donde el promotor es el 35S del virus del mosaico de la coliflor.

5. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la secuencia reguladora de la expresión
génica de (b) es un terminador.

30 6. Vector de expresión según la reivindicación 5 donde el terminador es el 35S del virus del mosaico de la coliflor.

7. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la proteasa de (d) y/o (e) es NlaPro.

35 8. Vector de expresión según la reivindicación 7 donde la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro de (d) es
SEQ ID NO: 1.

9. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde la diana de reconocimiento de la
proteasa NlaPro de (e) es SEQ ID NO: 2.

40 10. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la proteína heteróloga codificada por
la secuencia nucleotídica de (c) es una proteína repórtter seleccionada de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3, SEQ
ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

45 11. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la secuencia nucleotídica de (c)
codifica para al menos dos proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa.

12. Vector de expresión según la reivindicación 11 donde la proteasa es NlaPro.

50 13. Vector de expresión según la reivindicación 12 donde la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro que
separa las dos proteínas heterólogas entre sí es SEQ ID NO: 2.

55 14. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde las dos proteínas heterólogas
codificadas por la secuencia nucleotídica de (c) son dos proteínas repórtter seleccionadas de la lista que comprende:
SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

15. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la secuencia nucleotídica de (c)
codifica para al menos tres proteínas heterólogas separadas entre sí por una diana de reconocimiento de una proteasa.

60 16. Vector de expresión según la reivindicación 15 donde la proteasa es NlaPro.

17. Vector de expresión según la reivindicación 16 donde la diana de reconocimiento de la proteasa NlaPro que
separa las tres proteínas heterólogas entre sí es SEQ ID NO: 2.

65 18. Vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 donde las tres proteínas heterólogas
codificadas por la secuencia nucleotídica de (c) son las proteínas repórtter SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID
NO: 5.

ES 2 370 673 A1

19. Célula que comprende de forma transitoria o de forma estable:
- a. el vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y
 - b. una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus*.
20. Célula según la reivindicación 19 que pertenece a una especie vegetal.
21. Polen que comprende la célula según la reivindicación 20.
22. Planta que comprende la célula según la reivindicación 20.
23. Planta según la reivindicación 22 que pertenece a la especie *Nicotiana tabacum*.
24. Germoplasma de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23.
25. Uso del vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la expresión de al menos una proteína heteróloga.
26. Uso del vector según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 para la expresión de al menos dos proteínas heterólogas.
27. Uso del vector según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 para la expresión de al menos tres proteínas heterólogas.
28. Uso de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 o de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 para la producción de al menos una, dos o tres proteínas heterólogas.
29. Método para la obtención de al menos una proteína heteróloga que comprende:
- a. transfectar, de manera simultánea o secuencial, una célula con la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus* y con el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
 - b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - c. purificar la proteína heteróloga expresada en la célula cultivada en el paso (b).
30. Método para la obtención de al menos dos proteínas heterólogas que comprende:
- a. transfectar, de manera simultánea o secuencial, una célula con la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus* y con el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14,
 - b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - c. purificar las proteínas heterólogas expresadas en la célula cultivada en el paso (b).
31. Método para la obtención de al menos tres proteínas heterólogas que comprende:
- a. transfectar una célula que expresa la proteína NIb de un *Potyvirus* con el vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18,
 - b. cultivar la célula transfectada en el paso (a), y
 - c. purificar las proteínas heterólogas expresadas en la célula cultivada en el paso (b).

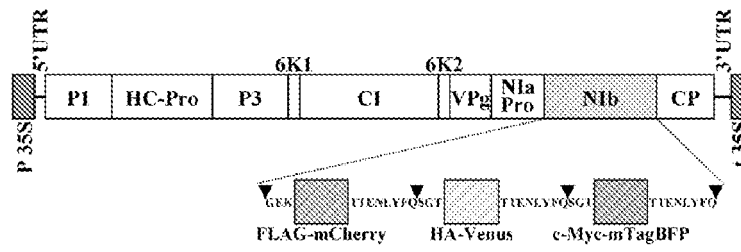


FIG. 1

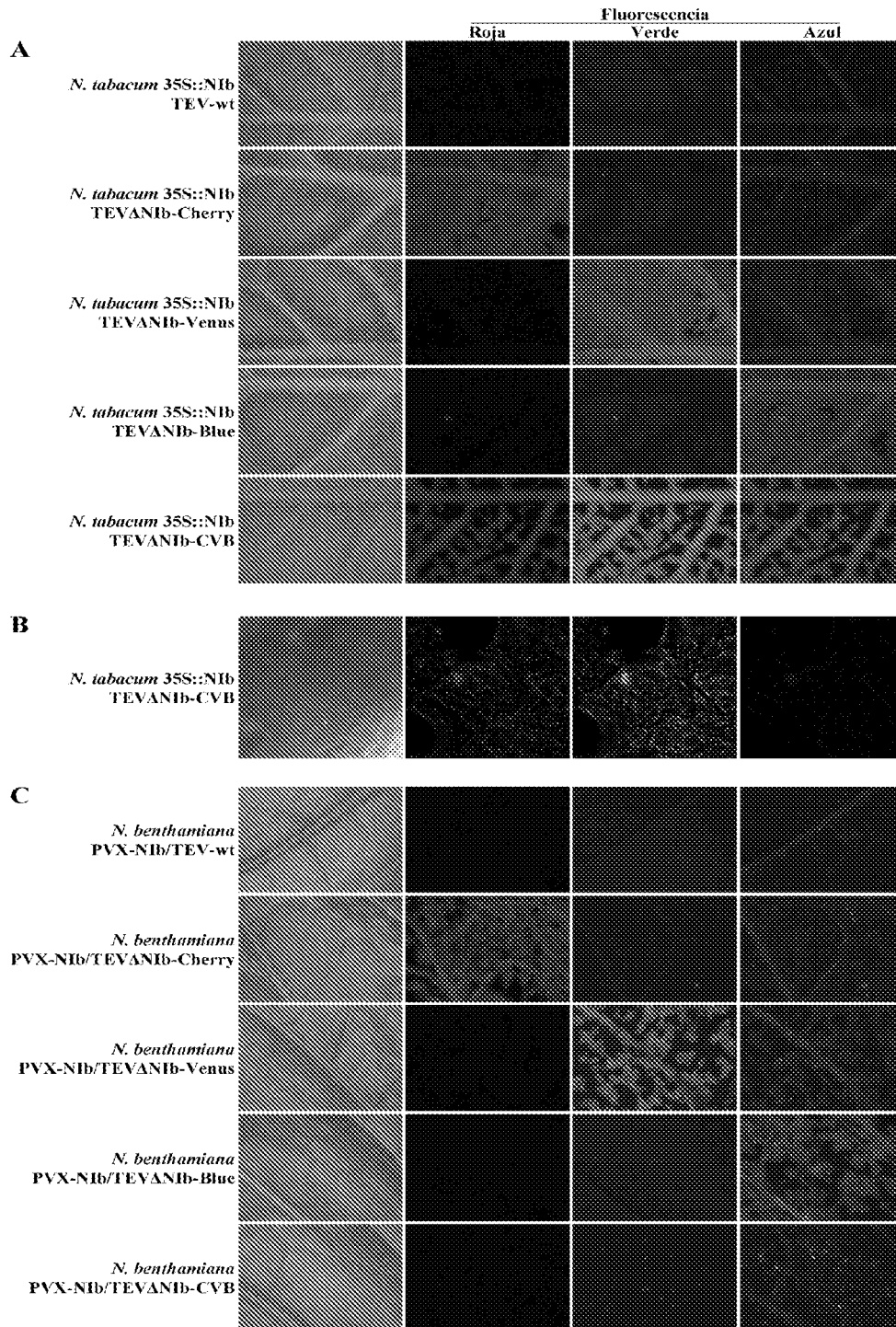


FIG. 2

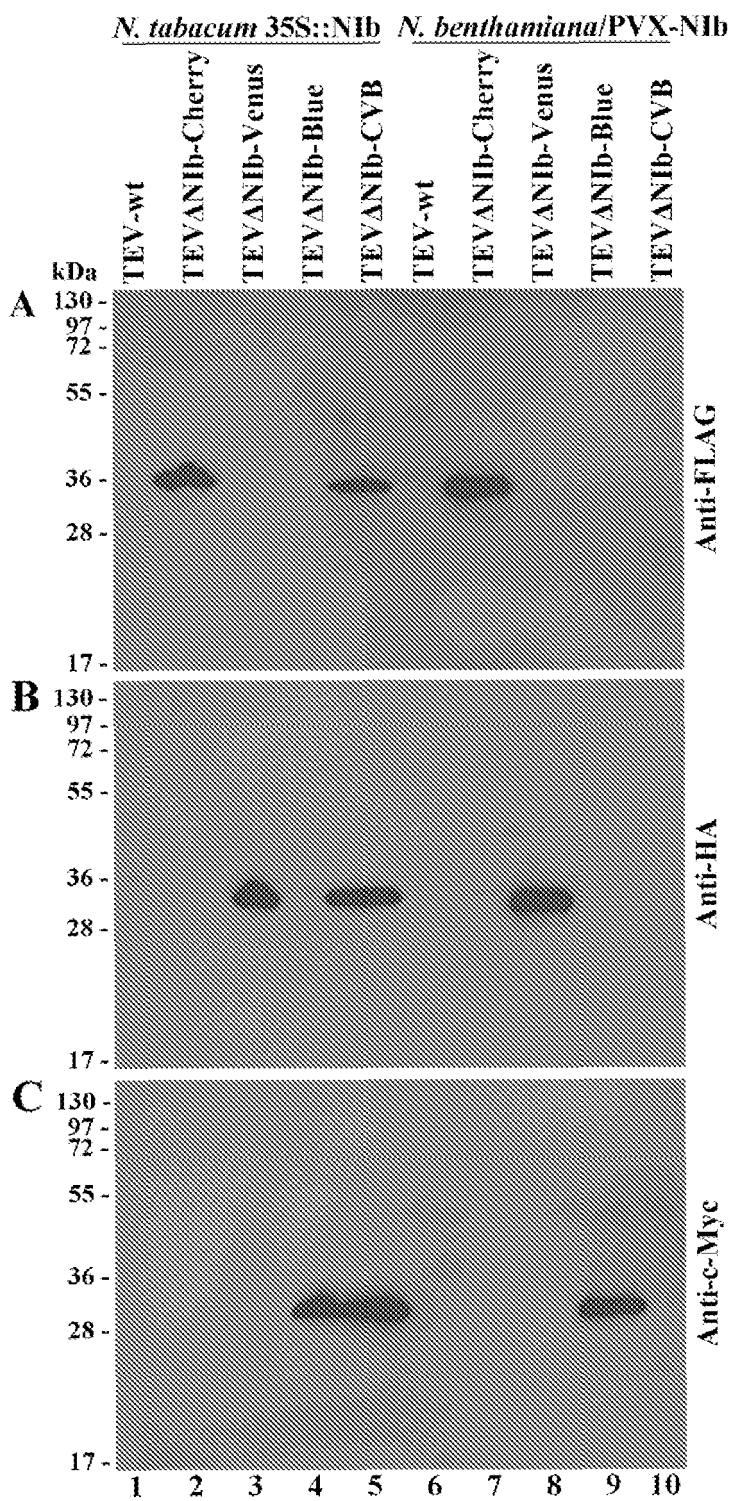


FIG. 3

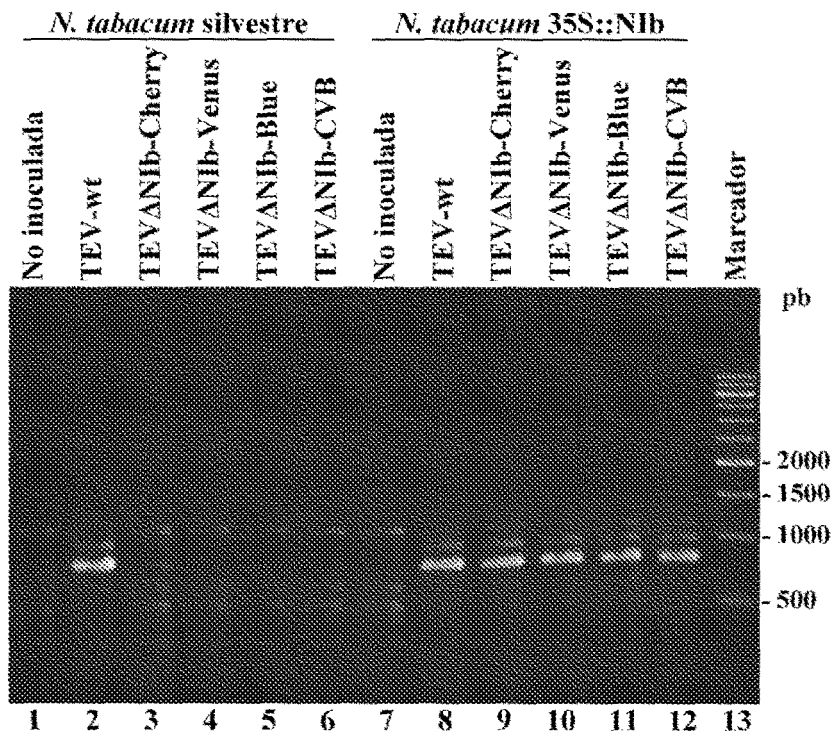


FIG. 4

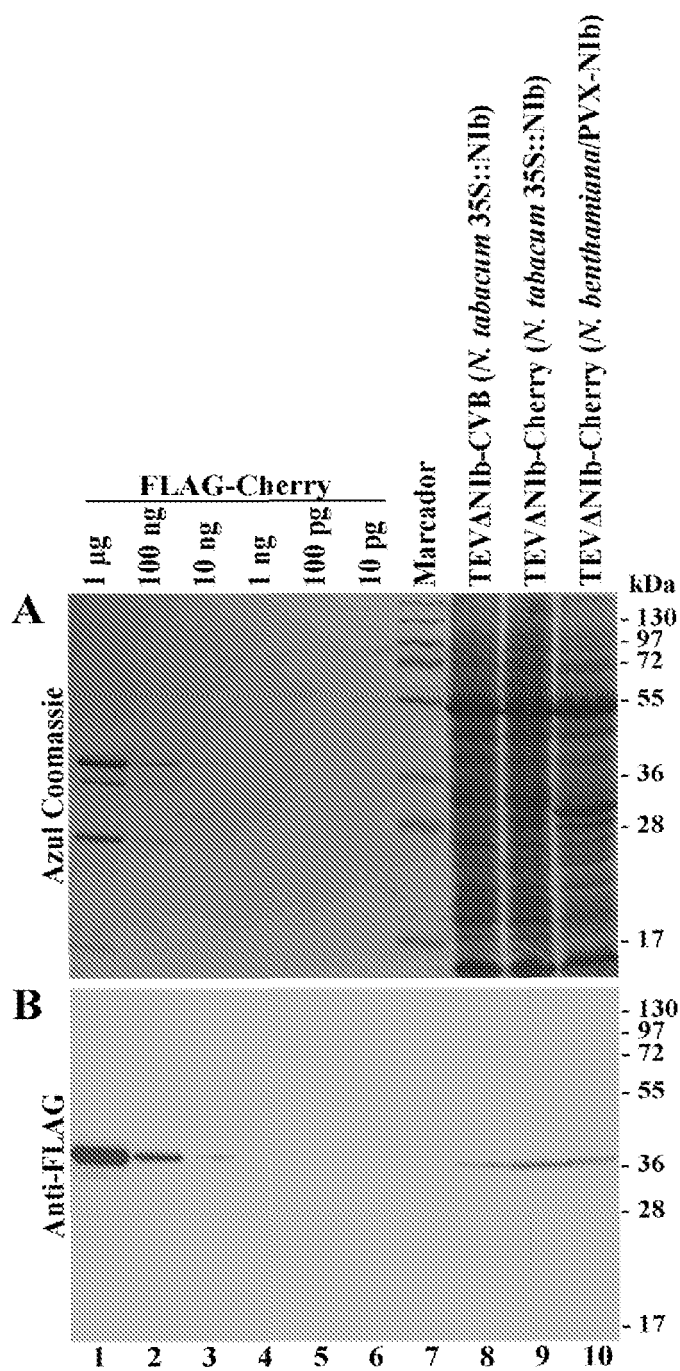


FIG. 5

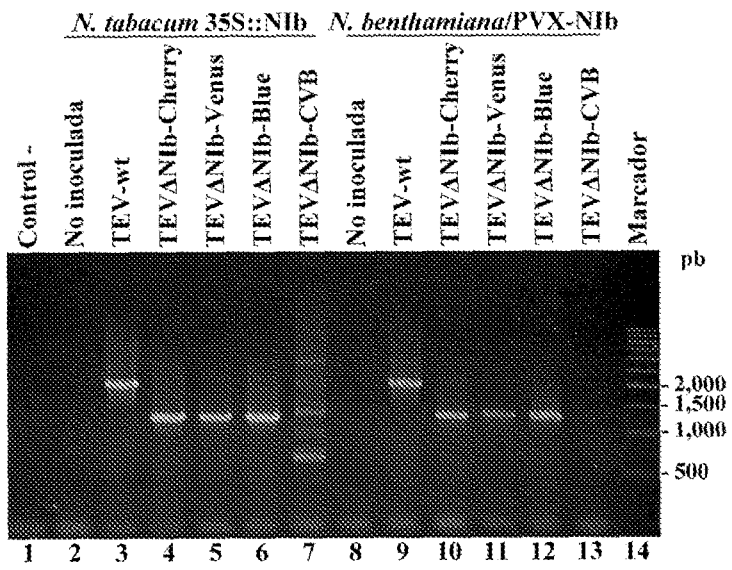


FIG. 6

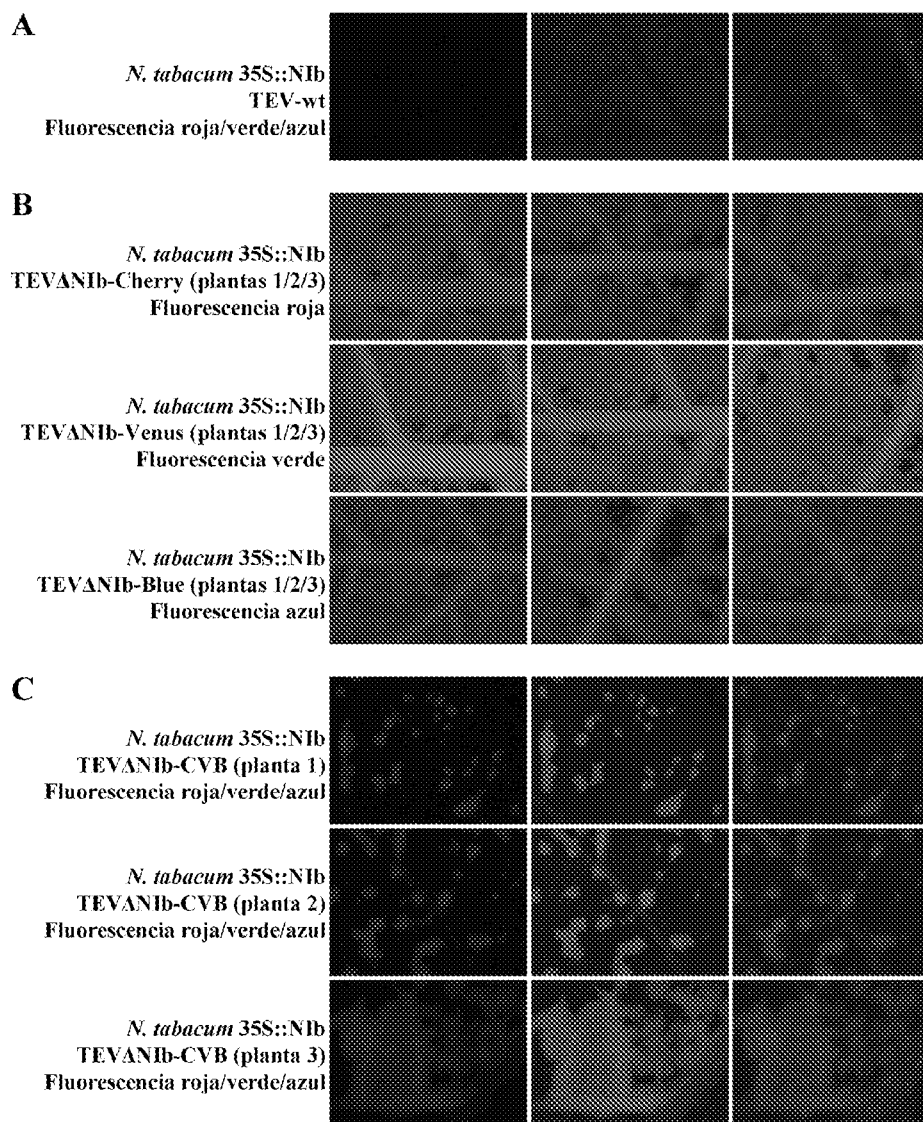


FIG. 7

ES 2 370 673 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC) (50%)
Universidad Politécnica de Valencia (50%)

5

<120> “Vector para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares”

<130> ES1641.687

10

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

20

<213> *Tobacco etch virus*

<400> 1

25

Met Ser Glu Leu Val Tyr Ser Gln Gly Glu Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 11

30

<212> PRT

<213> *Tobacco etch virus*

<400> 2

35

Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Thr
1 5 10

40

<210> 3

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

45

<220>

<223> Proteína mCherry marcada con la etiqueta FLAG y con mutaciones silenciosas

50

<400> 3

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp
1 5 10 15

55

Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu
20 25 30

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly
35 40 45

60

Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly
50 55 60

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr
65 70 75 80

65

Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu
85 90 95

ES 2 370 673 A1

Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe
 100 105 110

5
 Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp
 115 120 125

10
 Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser
 130 135 140

15
 Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser
 145 150 155 160

20
 Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln
 165 170 175

25
 Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr
 180 185 190

30
 Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val
 195 200 205

35
 Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val
 210 215 220

40
 Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp
 225 230 235 240

45
 Glu Leu Tyr Lys

50
 <210> 4
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

55
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Met Val Ser Lys Gly Glu Glu
 1 5 10 15

60
 Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 20 25 30

65
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 35 40 45

70
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 50 55 60

75
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys

ES 2 370 673 A1

	65	70	75	80
5	Phe Ala Arg Tyr	Pro Asp His Met Lys	Gln His Asp Phe Phe	Lys Ser
		85	90	95
10	Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp			
		100	105	110
15	Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr			
		115	120	125
20	Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly			
		130	135	140
25	Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val			
		145	150	155
30	Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys			
		165	170	175
35	Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr			
		180	185	190
40	Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn			
		195	200	205
45	His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys			
		210	215	220
50	Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr			
		225	230	235
55	Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
		245		
60	<210> 5			
	<211> 243			
	<212> PRT			
	<213> Artificial Sequence			
65	<220>			
	<223> Proteína mTagBFP marcada con la etiqueta c-Myc			
70	<400> 5			
75	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Met Ser Glu Leu Ile Lys			
	1	5	10	15
80	Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asp Asn His			
		20	25	30
85	His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr			
		35	40	45

ES 2 370 673 A1

Gln Thr Met Arg Ile Lys Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala
 50 55 60
 5 Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Leu Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile
 65 70 75 80
 10 Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu
 85 90 95
 15 Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu
 100 105
 20 Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn
 115 120 125
 25 Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Thr Ser Asn Gly Pro Val Met Gln
 130 135 140
 30 Lys Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Phe Thr Glu Thr Leu Tyr Pro Ala
 145 150 155 160
 35 Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Asn Asp Met Ala Leu Lys Leu Val Gly
 165 170 175
 40 Gly Ser His Leu Ile Ala Asn Ile Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys
 180 185 190
 45 Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Val Tyr Tyr Val Asp Tyr Arg
 195 200 205
 50 Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asn Asn Glu Thr Tyr Val Glu Gln His
 210 215 220
 55 Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp Leu Pro Ser Lys Leu Gly His
 225 230 235 240

Lys Leu Asn

50 <210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

55

<220>

<223> Cebador PI para amplificar el cDNA de mCherry a partir de pmCherry

60 <400> 6

ggcgggtctc ggaaggacta caaggacgac gatgacaaaa tggtagcaa aggcgaggag

60

<210> 7

65 <211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 370 673 A1

<220>

<223> Cebador PII para amplificar el cDNA de mCherry a partir de pmCherry

5 <400> 7

ggcgggtctc gtcgtcttat acagctcatc catgc

35

<210> 8

10 <211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> Cebador PIII para amplificar el cDNA de Venus a partir de pDH51-GW-YFP

<400> 8

20

ggcgggtctc ggaagtaccc atacgatggt ccagattacg ctatggtgag caagggcgag

60

gag

63

25 <210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Cebador PIV para amplificar el cDNA de Venus a partir de pDH51-GW-YFP

35 <400> 9

ggcgggtctc gtcgtcttgt acagctcgtc catgc

35

<210> 10

40

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45

<220>

<223> Cebador PV para amplificar el cDNA de mTagBFP a partir de pmTagBFP

<400> 10

50

ggcgggtctc ggaaggaaca aaaacttatt tctgaagaag atctgatgag cgagctgatt

60

aaggag

66

55 <210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> Cebador PVI para amplificar el cDNA de mTagBFP a partir de pmTagBFP

65 <400> 11

ggcgggtctc gtcgtattaa gcttgtgcc cagtttg

37

ES 2 370 673 A1

	<210> 12	
	<211> 33	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Cebador PVII para amplificar pTEV89	
10	<400> 12	
	ggcgggtctc gcttctcccc ttgcgagtac acc	33
15	<210> 13	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> Cebador PVIII para amplificar pTEV89	
25	<400> 13	
	ggcgggtctc gacgactgag aatctttatt ttc	33
30	<210> 14	
	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> Cebador PIX para amplificar el cDNA de FLAG-mCherry a partir de pTEV89ANlb-Cherry	
40	<400> 14	
	ggcgggtctc gagtgccgct ttggaagtac aagttttcag tcgtcttata cagctcatcc	60
	atgc	64
45	<210> 15	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> Cebador PX para amplificar el cDNA de HA-Venus a partir de pTEV89ANlb-Venus	
55	<400> 15	
	ggcgggtctc gcacttacc atacgatggt ccagattac	39
60	<210> 16	
	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
65	<220>	
	<223> Cebador PXI para amplificar el cDNA de HA-Venus a partir de pTEV89ANlb-Venus	

ES 2 370 673 A1

	<400> 16	
	ggcgggtctc gtgtacctga ttgaaagtag aggttctctg tagtcttgta cagctcgtcc	60
5	atgc	64
	<210> 17	
	<211> 37	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
15	<223> Cebador PXII para amplificar el cDNA de c-Myc-mTagBFP a partir de pTEV89ANlb-Blue	
	<400> 17	
	ggcgggtctc gtacagaaca aaaacttatt tctgaag	37
20	<210> 18	
	<211> 32	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Cebador PXIII para amplificar el cDNA de la Nlb del TEV a partir de pGTEV	
30	<400> 18	
	ggcgcgatcgat gggggagaag aggaaatggg tc	32
35	<210> 19	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Cebador PXIV para amplificar el cDNA de la Nlb del TEV a partir de pGTEV	
45	<400> 19	
	ggcgggtctc gtcgatcact gaaaataaag attctcagtc	40
	<210> 20	
50	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
55	<220>	
	<223> Cebador PXV complementario a las posiciones 9.471-9.495 de TEV-DQ986288	
60	<400> 20	
	ctcgcactac ataggagaat tagac	25
	<210> 21	
65	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 370 673 A1

	<220>	
	<223> Cebador PXVI homólogo a las posiciones 8.518-8.542 de TEV-DQ986288	
5	<400> 21	
	ctcgcactac ataggagaat tagac	25
	<210> 22	
10	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Cebador PXVII complementario a las posiciones 9.289-9.306 de TEV-DQ986288	
	<400> 22	
20	ctcgcactac ataggagaat tagac	25
	<210> 23	
25	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> Cebador PXVIII homólogo a las posiciones 6.506-6.530 de TEV-DQ986288	
	<400> 23	
35	ctcgcactac ataggagaat tagac	25
	<210> 24	
	<211> 25	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
45	<223> Cebador PXIX complementario a las posiciones 8.500-8.526 de TEV-DQ986288	
	<400> 24	
50	ctcgcactac ataggagaat tagac	25
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030342

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/83** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MASUTA C., et al. Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. 2000. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 23(4), páginas 539-546. Página 542.	1-7,10-12,14-16, 18-24
X	KELLONIEMI J., et al. Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: Infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. 2008. <i>Virus Research</i> . Vol. 135, páginas 282-291. Página 284.	1-7,10-12,14-16, 18-24
X	ES2161130 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.11.2001, páginas 19,20.	1-7,10-12,14-16, 18-24

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
18.11.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

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

C12N

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, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8, 9, 13, 17, 25-31	SI
	Reivindicaciones 1-7, 10-12, 14-16 y 18-24	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	MASUTA C., et al. Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 23(4), páginas 539-546.	2000
D02	KELLONIEMI J., et al. Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: Infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. <i>Virus Research</i> . Vol. 135, páginas 282-291.	2008
D03	ES2161130 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS).	16.11.2001

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

La solicitud de patente divulga un vector para la coexpresión de varias proteínas heterólogas en cantidades equimolares.

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan vectores que comprenden la secuencia nucleotídica de un *Potyvirus* para la expresión de proteínas heterólogas.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

Las reivindicaciones 1-7, 10-12, 14-16 y 18 reivindican un vector de expresión que comprende: A) La secuencia nucleotídica del genoma de un *Potyvirus* cuyo cistrón NIb se encuentra completamente delecionado. B) Al menos una secuencia reguladora. C) Una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga insertada en la región correspondiente al cistrón NIb delecionado. D) y E) Dos secuencias nucleotídicas (una de ellas situada en el extremo 5' de C) y la otra situada en el extremo 3') que codifican para dianas de reconocimiento de una proteasa. En las reivindicaciones 19-24 se reivindican células, polen y plantas que comprende dicho vector así como una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína NIb de un *Potyvirus*.

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan (en la página 542 el documento D01; en la página 284 el documento D02 y en las páginas 19 y 20 el documento D03) un vector que comprende: A) La secuencia nucleotídica de un *Potyvirus*. B) El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. C) Una secuencia nucleotídica que codifica para al menos una proteína heteróloga. D) Secuencias nucleotídicas que codifican para dianas de reconocimiento de una proteasa.

Las diferencias entre el vector reivindicado en la solicitud de patente y los vectores divulgados en los documentos D01, D02 y D03 residen básicamente en que los vectores divulgados en los documentos D01, D02 y D03 no presenta el cistrón NIb delecionado y en el que el punto de inserción de la proteína heteróloga es diferente al que se muestra en el vector reivindicado en la solicitud de patente. La realización de la construcción del vector reivindicado en la solicitud de patente no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia a partir de la información divulgada en los documentos D01, D02 y D03. Del mismo modo que, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia la obtención de una célula que comprendiese dicho vector y una secuencia nucleotídica que codifique para la proteína NIb de un *Potyvirus*. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01, D02 y D03 las reivindicaciones 1-7, 10-12, 14-16 y 18-24 presentan novedad, pero no actividad según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.