

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 377 617**

② Número de solicitud: 201001115

⑤ Int. Cl.:  
**C07K 1/14** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **31.08.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**29.03.2012**

⑦ Solicitante/s: **IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.**  
c/ Conde Oliveto, nº 2 - 3º Izda.  
31002 Pamplona, Navarra, ES

⑦ Inventor/es: **Pozueta Romero, Francisco Javier;**  
**Baroja Fernández, Miren Edurne y**  
**Muñoz Pérez, Francisco José**

⑦ Agente/Representante:  
**Buceta Facorro, Luis**

⑤ Título: **Procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas.

La invención se refiere a un procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas, mediante la producción de plantas transgénicas que expresan las proteínas recombinantes fusionadas con proteínas asociadas al gránulo de almidón a través de una secuencia reconocida por una proteasa. Este procedimiento permite la purificación de la proteína mediante etapas simples de homogeneización, centrifugación y tratamiento con la proteasa. Así mismo, la invención se refiere a los vectores, hospedadores, células y plantas empleados en dicho procedimiento.

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se engloba dentro del campo de la ingeniería genética y de la biotecnología. Concretamente, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de proteínas heterólogas recombinantes purificadas, mediante la producción de plantas transgénicas que expresan las proteínas recombinantes fusionadas con proteínas asociadas al gránulo de almidón a través de una secuencia reconocida por una proteasa. Este procedimiento permite la purificación de la proteína mediante etapas simples de homogeneización, centrifugación y tratamiento con la proteasa. Así mismo, la invención se refiere a los vectores, hospedadores, células y plantas empleados en dicho procedimiento.

**15 Antecedentes de la invención**

La utilización de plantas como biofactorías (molecular pharming) se refiere al empleo de plantas para producir compuestos de alto valor añadido que puedan aplicarse a las diferentes industrias, como la farmacéutica, alimenticia, química, etc. Se trata de modificar genéticamente las plantas con el fin de producir el compuesto de interés.

20 Los sistemas de producción de proteínas recombinantes de interés industrial actualmente emplean bacterias, levaduras y células de mamíferos en cultivo, pero cada uno de estos sistemas presenta sus limitaciones. La utilización de plantas como biofactorías presenta ventajas económicas (costes menores en la producción a gran escala), de seguridad del producto (se evita el riesgo de arrastrar patógenos desde tejidos animales en los procesos de extracción y purificación) y técnicas (en algunos casos las plantas pueden constituir el único sistema capaz de producir eficientemente ciertas proteínas humanas, tales como reguladores del crecimiento e inhibidores del ciclo celular, que tendrían un impacto negativo en los animales transgénicos o en las células animales cultivadas en las que se expresaran) (Giddings 2001; Ma *et al.* 2003; Twyman *et al.* 2003). Por otro lado, proteínas expresadas en semillas pueden permanecer estables durante años a temperatura ambiente sin perder su actividad (Giddings 2001; Ma *et al.* 2003). Actualmente se están produciendo proteínas de interés terapéutico en una amplia variedad de plantas que incluyen tabaco, cereales, oleaginosas, frutas, hortalizas, forrajeras y algas unicelulares (Twyman *et al.* 2003; Fischer *et al.* 2004).

Las proteínas recombinantes expresadas en bacterias son proteínas que no requieren glicosilación para ser activas y generalmente se acumulan en agregados insolubles cuyos costes de purificación y renaturalización no son sostenibles. Cuando las proteínas recombinantes requieren procesos de modificación postraduccionales se utilizan otros sistemas de expresión tales como cultivos celulares de mamíferos que implican un alto costo inicial para su obtención y grandes inversiones adicionales cuando se requiere incrementar la escala de producción. Este problema puede ser solucionado mediante la utilización de plantas como biofactorías, ya que los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas y las modificaciones post-traduccionales son los propios de las células eucariotas y permiten la producción y ensamblado de proteínas complejas.

40 Los objetivos actuales de la industria del “molecular pharming” van encaminados a la obtención de nuevos productos y al incremento de la productividad. Ésta última está determinada en gran medida por los procesos de producción y purificación (Twyman *et al.* 2005). La mayoría de los costes de producción de una proteína recombinante no recaen en la fase de producción, sino en los procesos posteriores de purificación del producto. Así pues la producción de proteínas recombinantes en ciertos órganos de las plantas o con tecnologías de expresión que localicen a las proteínas recombinantes en un orgánulo en particular de la célula que facilite su purificación, parece un objetivo fundamental a la hora de plantearse el “molecular pharming” como un negocio rentable. Ejemplos de estos nuevos avances son la fusión de proteínas de interés a la oleosina, un tipo de proteína de membrana que forma parte de los cuerpos grasos de las semillas (Markley *et al.* 2006). Este método de purificación de proteínas recombinantes unidas a oleosinas está basado en la homogeneización de tejidos y posterior purificación de los cuerpos grasos de plantas transgénicas tras un simple paso de centrifugación del homogeneizado y flotación de los cuerpos grasos. Ello, sin embargo, no impide que muchas proteínas solubles contaminen las preparaciones de cuerpos grasos, dificultando la purificación posterior de proteínas recombinantes unidas a las oleosinas. Otras técnicas empleadas son la utilización de pequeñas proteínas de carácter hidrofóbico (hidrofobinas) fusionadas a la proteína recombinante que facilitan su purificación (Joensuu *et al.* 2010), la producción de proteínas recombinantes que contengan secuencias de integración en la membrana plasmática de las células (Schillberg *et al.* 2000) o la secreción de las proteínas recombinantes al espacio extracelular o apoplasto (Borisjuk *et al.* 1999). Sin embargo, todas estas técnicas de purificación de proteínas recombinantes presentan problemáticas similares a la descrita anteriormente basada en la utilización de oleosinas recombinantes.

60 En la presente invención, se describe por primera vez una estrategia para producir plantas transgénicas que expresen ectópicamente proteínas fusionadas con proteínas unidas al gránulo de almidón (p. ej.: GBSS) a través de una secuencia reconocida por una proteasa. De esta forma la proteína de interés queda anclada al gránulo de almidón, cuya elevada densidad permite una fácil purificación del resto de componentes celulares tras un simple paso de homogeneización del tejido, centrifugación, tratamiento con proteasa y una nueva centrifugación. Por tanto, el nuevo método propone la solubilización de la proteína de interés unida a una estructura no soluble, fácilmente separable de las proteínas solubles del medio. Consecuentemente, el método propuesto es mucho más eficiente que los métodos empleados hasta la fecha, ya que se basa en un simple paso de precipitación.

**Breve descripción de la invención**

El problema a resolver por la presente invención consiste en permitir la producción a gran escala de proteínas recombinantes purificadas a bajo coste. La solución planteada consiste en un procedimiento basado en la obtención de plantas transgénicas que expresan ectópicamente la proteína recombinante fusionada con una proteína unida al gránulo de almidón, a través de una secuencia de corte de una proteasa. Esto facilita la purificación mediante homogeneización, centrifugación, tratamiento con la proteasa y nueva centrifugación.

Consecuentemente, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de proteínas heterólogas recombinantes purificadas, que comprende las siguientes etapas:

a) obtener una planta transgénica mediante transformación de una planta silvestre con un vector de expresión que comprende, en dirección 5'-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-diquinasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés.

b) cultivar la planta transgénica de la etapa a) en condiciones apropiadas para su crecimiento;

c) homogeneizar cualquier tejido de la planta que acumule almidón, seleccionado de: tubérculos, hojas, frutos y semillas;

d) centrifugar y seleccionar la fracción de densidad más elevada, que contiene las proteínas del gránulo de almidón;

e) tratar con la proteasa que reconoce el sitio de corte comprendido en la secuencia descrita en la etapa a);

f) centrifugar y purificar la proteína heteróloga a partir del sobrenadante, mediante cualquier técnica de separación por tamaños, inmunoadsorción, intercambio iónico o detección de fluorescencia.

En el procedimiento de la invención, se utilizó la GBSS como ejemplo de proteína unida al gránulo de almidón. Para obtener el vector de transformación, se empleó un vector intermedio, obtenido mediante la tecnología GATEWAY, que permite fusionar con GBSS la secuencia codificadora de cualquier proteína de interés. Por tanto, un aspecto adicional de la invención describe un vector diseñado específicamente para su uso en el procedimiento de la invención, que comprende, en sentido 5'-3-, un promotor, una secuencia que codifica la GBSS y una secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attR1 y attR2, el cual permite clonar aguas abajo de GBSS cualquier secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attL1 y attL2.

La invención se refiere así mismo a un organismo hospedador que alberga el vector anteriormente descrito, concretamente *E. coli*.

La obtención de la planta transgénica empleada en el procedimiento descrito anteriormente requiere la transformación con vectores de expresión específicamente diseñados, según se describen en la etapa a) del procedimiento. Por tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector de expresión utilizado para transformar la planta transgénica, que comprende, en dirección 5'-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-diquinasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés.

Otro aspecto de la invención se refiere a un organismo hospedador que incluye dicho vector.

En aspectos adicionales de la invención se describen las células vegetales transformadas con el hospedador citado y las plantas transgénicas constituidas por dichas células.

Los efectos técnicos mostrados en la presente invención son extrapolables a órganos de la planta que acumulen almidón tales como tubérculos, hojas, frutos y semillas, así como a cualquier tipo de planta que acumule almidón como por ejemplo *Arabidopsis*, patata, tabaco, tomate, arroz, cebada, trigo y maíz. Los resultados mostrados en la presente invención se consiguieron expresando constitutivamente el casete formado por el gen GBSS de *Arabidopsis thaliana*, una secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa trombina y un gen clonado en una secuencia de recombinación GATEWAY flanqueada por secuencias attR1 y attR2. Como caso concreto e ilustrativo de la invención se presenta la purificación de la proteína verde fluorescente (GFP), aunque la invención puede aplicarse a cualquier otra proteína de interés. Para la expresión constitutiva de la proteína se emplea el promotor 35S, pero cualquier otro promotor que permita la expresión ectópica de GBSS fusionada a una proteína a través de una secuencia reconocida por una proteasa, estaría comprendido en la presente invención.

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

- 5 • *Planta transgénica*: planta cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de conseguir características biológicas diferentes y/o mejoradas respecto a las de la planta silvestre control (WT).
- *Célula vegetal transformada*: son células vegetales que presentan una alteración genética resultado de la introducción y expresión de material genético externo en su genoma.
- 10 • *Expresión ectópica de la proteína quimérica GBSS-trombina-GFP*: una planta expresa ectópicamente la proteína quimérica GBSS-trombina-GFP cuando una inmunotransferencia anti-GFP detecta una banda en un extracto de planta transformada que no se detecta en un extracto de planta WT cultivadas en las mismas condiciones y en el mismo momento. A modo ilustrativo, en la Figura 1 se puede observar que en un extracto proteico de plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que expresan *GBSS-thr-GFP* se detecta una banda del tamaño correspondiente a la proteína quimérica que no se detecta en extractos de plantas WT utilizando un anticuerpo específico de GFP. Otro método para confirmar que una planta expresa la proteína GBSS-trombina-GFP es mediante la detección de la fluorescencia emitida por la proteína GFP. Como muestra la Figura 2 la fluorescencia está localizada única y exclusivamente en el gránulo de almidón, confirmando que la GFP está unida a la GBSS.

### 20 Descripción de las figuras

Figura 1: Detección mediante inmunotransferencia anti-GFP de la proteína GBSS-trombina-GFP en plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan *GBSS-thr-GFP*.

Figura 2: Localización subcelular de GBSS-trombina-GFP. Las fotografías muestran la fluorescencia en células de plantas de *Arabidopsis* que expresan *GBSS-thr-GFP*, que han sido sometidas a análisis mediante un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON) equipado con un láser con excitación Ar 488, un filtro para emisión verde BA515/30 y un filtro para emisión roja BA650LP. En las fotografías puede observarse que la fluorescencia verde emitida por GBSS-trombina-GFP está asociada a los gránulos de almidón, confirmando así la unión de la GFP a la proteína GBSS. La fluorescencia roja es emitida por la clorofila existente en los plastidios.

Figura 3: Etapas para la construcción del plásmido pGWB2-GBSS gtw, que permite la introducción de la secuencia codificante de cualquier proteína de interés unida a la de la GBSS. Figura 3A: generación mediante tecnología GATEWAY de la construcción pGWB2-GBSS, que contiene el gen GBSS bajo el control del promotor 35S. Figura 3B: generación del plásmido pGWB2-GBSS gtw, que incorpora el casete de recombinación GATEWAY.

Figura 4: Etapas para la construcción del plásmido pGWB2-GBSS-Thr-GFP, necesario para la producción de plantas vía *A. tumefaciens* que expresen ectópicamente la GFP unida a la GBSS a través de una secuencia de aminoácidos reconocida por trombina (GBSS-trombina-GFP). Introducción de la secuencia Thr-GFP, mediante tecnología GATEWAY, en el vector pGWB2-GBSS gtw de la figura 3.

Figura 5: Análisis mediante inmunotransferencia de la proteína GFP usando anticuerpos anti-GFP. Los gránulos de almidón purificados de plantas transgénicas que expresan GBSS-Thr-GFP fueron sometidos a tratamiento con o sin la proteasa trombina. Tras ello fueron sometidos a un paso de centrifugación a 1.000 g durante 10 minutos. De izquierda a derecha: gránulos de almidón y sobrenadantes obtenidos tras centrifugación de gránulos de almidón no tratados y tratados con trombina, respectivamente.

### 50 Descripción detallada de la invención

A fin de evaluar la eficacia de la fusión de proteínas heterólogas con proteínas asociadas al gránulo de almidón, se fusionó la secuencia codificadora de la proteína GFP con la de la GBSS a través de una secuencia reconocida por trombina, introduciendo dicha construcción, p. ej.: vía *Agrobacterium tumefaciens*, en células de plantas transgénicas. Como conclusión general, se observó que la transformación con la secuencia quimérica obtenida facilita considerablemente la obtención en forma purificada de la proteína heteróloga.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de proteínas heterólogas recombinantes purificadas, que comprende las siguientes etapas:

60 a) obtener una planta transgénica mediante transformación de una planta silvestre con un vector de expresión que comprende, en dirección 5-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica, una proteína unida al gránulo de almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-diquinasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés.

65 b) cultivar la planta transgénica de la etapa a) en condiciones apropiadas para su crecimiento;

## ES 2 377 617 A1

c) homogeneizar cualquier tejido de la planta que acumule almidón, seleccionado de: tubérculos, hojas, frutos y semillas;

d) centrifugar y seleccionar la fracción de densidad más elevada, que contiene las proteínas del gránulo de almidón;

e) tratar con la proteasa que reconoce el sitio de corte comprendido en la secuencia descrita en la etapa a);

f) centrifugar y purificar la proteína heteróloga a partir del sobrenadante, mediante cualquier técnica de separación por tamaños, inmunodetección, intercambio iónico o detección de fluorescencia.

En una realización preferida de la invención el promotor empleado en la etapa a) es constitutivo, siendo preferentemente el promotor de RNA 35S, no obstante, se podría utilizar cualquier otro promotor empleado habitualmente.

Cualquiera de las proteínas que se unen al gránulo de almidón o cualquier proteína con un porcentaje de homología de al menos 60% con las mismas y que mantenga su capacidad de unión al gránulo de almidón, está incluida dentro del alcance de la invención, constituyendo realizaciones preferentes aquéllas en las que, en la etapa a) del procedimiento, la proteína unida al gránulo de almidón codificada por la secuencia nucleotídica es: R1; una enzima ramificadora de almidón, seleccionada de BEI, BEIIa, y BEIIb; almidón-fosforilasa plastidial; almidón-sintasa soluble, seleccionada de SSI, SSII y SSIII; ó GBSS.

Una realización preferente se refiere al caso en el que la proteína unida al gránulo de almidón codificada es la GBSS o una proteína con al menos un 60% de homología con la GBSS, que se una al gránulo de almidón. El caso más preferido es aquel en el que dicha proteína es la GBSS.

La molécula quimérica descrita en la etapa a) de este último procedimiento podría incluir un sitio de corte para cualquier proteasa, a condición de que la proteasa empleada posteriormente en el proceso de purificación reconozca dicho sitio y no una secuencia interna de la proteína de interés. En una realización preferida, el sitio de corte es específico para trombina.

En la etapa a) del procedimiento descrito, la proteína recombinante de interés codificada por la secuencia nucleotídica puede ser cualquier proteína de interés. En la presente invención, se realizaron pruebas experimentales con proteína verde fluorescente (GFP), que permite una fácil visualización de los resultados. Por tanto, una realización preferida de la invención se refiere a un caso particular del procedimiento descrito anteriormente, en el que la proteína de interés codificada, es la GFP.

Con mayor preferencia, la secuencia nucleotídica codificante descrita en la etapa a) del procedimiento comprende la secuencia quimérica o casete de expresión, representado por SEQ ID N°: 1, que consiste en las secuencias nucleotídicas que, secuencialmente, codifican la proteína GBSS, un sitio de corte para trombina y la proteína GFP.

La secuencia SEQ ID N°: 1 expresa un polipéptido de fusión, de secuencia SEQ ID N°: 2, consecuentemente, una realización adicional se refiere al procedimiento en el que la secuencia nucleotídica expresa un polipéptido purificado, cuya secuencia comprende la secuencia representada por SEQ ID N°: 2.

En una realización del procedimiento de la invención, se utilizó la GBSS como ejemplo de proteína unida al gránulo de almidón. Para obtener el vector de transformación, se empleó un vector intermedio diseñado específicamente para su uso en dicho procedimiento, obtenido mediante la tecnología GATEWAY, que permite fusionar con la GBSS la secuencia codificadora de cualquier proteína de interés. Por tanto, una realización adicional de la invención describe un procedimiento de obtención de proteínas heterólogas en el que, para la obtención del vector de la etapa a), se emplea un vector que comprende, en sentido 5'-3', el promotor de RNA 35S, una secuencia que codifica la GBSS y una secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attR1 y attR2, que es el vector *pGWB2-GBSS gtw*, descrito en detalle en el ejemplo 1 y en la figura 3, el cual permite clonar aguas abajo de GBSS cualquier secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attL1 y attL2.

En realizaciones aún más preferidas, el citado vector se introduce en un hospedador bacteriano. El caso más preferido es aquel en el que el hospedador es *E. coli*.

La tecnología GATEWAY simplifica considerablemente el procedimiento de clonaje, sin embargo, el vector de expresión utilizado en el procedimiento de la invención se puede obtener mediante cualquier otra estrategia de clonaje conocida, p. ej.: corte y pegado mediante enzimas de restricción, ligasas, y cualquier otra empleada en el sector.

En el procedimiento de la invención, para la obtención de la planta transgénica se utiliza preferiblemente el vector *pGWB2-GBSS-Thr-GFP*, que comprende, en sentido 5'-3': el promotor constitutivo de RNA 35S, una secuencia que codifica la GBSS, una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos reconocida por trombina y una secuencia que codifica la GFP. Dicho vector se introduce preferentemente a través de un hospedador bacteriano, preferiblemente *Agrobacterium tumefaciens*.

## ES 2 377 617 A1

Una realización preferida de la invención se refiere al caso en el que la planta transgénica empleada en el procedimiento descrito, pertenece a las especies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* o *Arabidopsis thaliana*, si bien la invención podría aplicarse a cualquier especie que produzca almidón.

5 Un aspecto adicional de la invención describe un vector diseñado específicamente para su uso en el procedimiento de la invención, que comprende, en sentido 5'-3', un promotor, una secuencia que codifica la GBSS y una secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attR1 y attR2, el cual permite clonar aguas abajo de GBSS cualquier secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attL1 y attL2. Dicho vector, podría incluir cualquier promotor habitualmente utilizado al efecto, así como cualquier terminador apropiado, y distintos marcadores de resistencia a antibióticos, sin  
10 alterar la esencia de la invención. Una realización preferida de la invención se refiere al caso en el que el promotor es el promotor de RNA 35S y el vector concreto es el vector *pGWB2-GBSS gtw*, según se describe en el ejemplo 1 y en la figura 3, especialmente diseñado para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a los hospedadores transformados con el vector citado. Dentro del alcance de  
15 la invención se puede considerar incluido cualquier hospedador que permita albergar dicho vector. Como realización preferida se contemplan los hospedadores bacterianos, y más concretamente *E. coli*.

La invención se refiere así mismo a un vector de expresión para uso en el procedimiento descrito, que comprende, en dirección 5'-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de  
20 almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-diquinasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés. En una realización preferida, el promotor empleado es el 35S y el vector es *pGWB2-GBSS-Thr-GFP*, según se describe en el ejemplo 1 y en la figura 4.

Otro aspecto de la invención describe un organismo hospedador transformado con dichos vectores, siendo prefe-  
25 rentemente dichos hospedadores bacterias, especialmente *A. tumefaciens*.

Un aspecto adicional se refiere a una célula vegetal transformada con estos organismos hospedadores.

30 Un aspecto relevante de la invención se refiere a las plantas transgénicas, sus semillas o material de propagación, constituidas por células vegetales transformadas con el hospedador que contiene el vector genérico, prefiriéndose el caso en el que el hospedador es *A. tumefaciens*. El tal caso, la planta lleva integrada en su genoma la secuencia SEQ ID N°: 1 y expresa en sus células la secuencia SEQ ID N°: 2. Se prefiere el caso en que dicha planta pertenece a las especies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* o *Arabidopsis thaliana*.

35 Los siguientes ejemplos ilustran en detalle la invención. No deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención.

### 40 Ejemplos

A continuación se procede a la exposición de los ejemplos, en los que se muestra detalladamente el procedimiento para la obtención de las plantas transgénicas que expresan proteínas recombinantes fusionadas a la proteína GBSS a través de una secuencia específicamente reconocida por una proteasa. Como ejemplo de proteína unida a la GBSS  
45 se utilizó la proteína fluorescente GFP. Como ejemplo de secuencia específicamente reconocida por una proteasa se utilizó la secuencia aminoacídica reconocida por la trombina.

#### Ejemplo 1

50 *Obtención y caracterización de plantas transgénicas que expresan GBSS-trombina-GFP*

##### *Obtención del plásmido pGWB2-GBSS gtw*

55 La producción de plantas transgénicas que expresen proteínas unidas a la GBSS a través de una secuencia aminoacídica reconocida específicamente por proteasas requiere la producción previa de un plásmido binario cuyas etapas de elaboración se ilustran en la Figura 3. La GBSS está codificada por el gen *At1g32900* de *A. thaliana*. A partir de su secuencia nucleotídica se sintetizaron oligonucleótidos específicos para el gen GBSS. Estos oligonucleótidos se emplearon para amplificar mediante RT-PCR a partir de RNA total de hojas de *Arabidopsis* el fragmento completo  
60 de cDNA que codifica la GBSS. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega), dando lugar al plásmido *pGBSS* que fue amplificado en la bacteria hospedadora XL1 Blue. A partir del plásmido *pGBSS* se amplificó el cDNA que codifica la GBSS flanqueado por sitios de recombinación attB utilizando los oligonucleótidos GBSS-attB1 (5'-ggggacaagtgtgacaaaaagcaggctaatggcaactgtgactgcttctc-3') y GBSS-attB2 (5'-ggggaccactttgta caagaaagctgggtatcacggcgtcgtcactgttctc-3'). El producto de PCR generado se clonó en el vector pDONR/Zeo mediante recombinación GATEWAY con los sitios de recombinación attP1 y attP2, dando lugar al plásmido *pDONR-GBSS*.  
65 Mediante una reacción de recombinación GATEWAY el gen GBSS fue transferido del plásmido pDONR-GBSS al plásmido *pGWB2* generando la construcción *pGWB2-GBSS* que contiene el gen GBSS bajo el control del promotor 35S. Utilizando como molde el plásmido *pGWB2-GBSS* y los oligonucleótidos 35S-HindIII (5'-cgtgctccaagcttacta

## ES 2 377 617 A1

gagccaagctgatctcc-3') y GBSS-XbaI (5'-ggctctagactcggcgtcgtctacgttctcc-3') se amplificó mediante PCR la secuencia 35S-GBSS (formada por el promotor 35S fusionado al gen GBSS flanqueada por los sitios de restricción HindIII y XbaI). En el plásmido *pGWB2* se reemplazó el promotor 35S por el producto de PCR 35S-GBSS mediante los sitios de restricción HindIII y XbaI, creándose el plásmido *pGWB2-GBSS gtw*, el cual comprende el promotor constitutivo 35S, el gen *GBSS* y un casete de recombinación GATEWAY flanqueado por secuencias attR1 y attR2 que permite la introducción de cualquier gen de interés para producir una proteína recombinante formada por la proteína de interés fusionada al extremo C-terminal de la proteína GBSS. El vector *pGWB2-GBSS gtw* se introdujo por electroporación en *E. coli*.

### Obtención del plásmido *pGWB2-GBSS-Thr-GFP*

La secuencia designada con el nombre *GFP-Thr* fue amplificada por PCR a partir de un cDNA que codifica para la proteína GFP utilizando los oligonucleótidos Thr-Egfp-attB1 (5'-ggggacaagttgtacaataagcaggcctaattcctggcgcgcggcagcatgtgagccaggcggcaggagc-3') y Egfp-attB2 (5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtattactgtacagctcgtccatgc-3'). El oligonucleótido Thr-Egfp-attB1 posee la secuencia attB1 (5'-atgctggtgccgcgcggcagc-3') seguida de la secuencia (5'-atgctggtgccgcgcggcagc-3) que codifica para un sitio de corte de la proteasa trombina y una secuencia (5'-catggtgagcaagggcggaggagc-3) que codifica para el extremo N-terminal de la proteína de interés (en este caso la GFP). El oligonucleótido Egfp-attB2 posee una secuencia nucleotídica (5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggta-3') que codifica para el extremo C-terminal de la proteína de interés (en este caso la GFP) seguida de la secuencia attB2 (5'-tactgtacagctcgtccatgc-3'). El producto de PCR generado se clonó mediante recombinación GATEWAY en el vector pDONR/Zeo, dando lugar al plásmido *pDONR-Thr-GFP*. A partir de *pDONR-Thr-GFP* y *pGWB2-GBSS gtw* se obtuvo por recombinación GATEWAY el plásmido *pGWB2-GBSS-Thr-GFP*, el cual comprende el promotor constitutivo 35S, el gen quimérico *GBSS-thromb-GFP* y el terminador Nos.

### Obtención de plantas transgénicas que expresan ectópicamente proteínas unidas a GBSS a través de una secuencia reconocida por trombina

El plásmido *pGWB2-GBSS-Thr-GFP* se introdujo por electroporación en *A. tumefaciens*. La cepa resultante se utilizó para transformar plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Solanum tuberosum* y *A. thaliana* según protocolos descritos en la literatura (Rocha-Sosa *et al.* 1989; Clough and Bent 1998; Voinnet *et al.* 1999).

El plásmido *pGWB2-GBSS-Thr-GFP* contiene el casete formado por el gen *GBSS* de *A. thaliana*, una secuencia que codifica el sitio de corte de la proteasa trombina y el gen que codifica para la GFP. La secuencia nucleotídica de este casete de expresión se representa en SEQ ID N°: 1. La secuencia aminoacídica deducida de la proteína GBSS-trombina-GFP se representa en SEQ ID N°: 2. Utilizando una cepa de *A. tumefaciens* (que alberga al plásmido *pGWB2-GBSS-Thr-GFP*) se obtuvieron plantas transgénicas de *N. benthamiana*, *A. thaliana* y patata que expresan *GBSS-thr-GFP* de manera constitutiva. Cuando se comparan con plantas no transformadas, las plantas que expresan la proteína quimérica GBSS-trombina-GFP acumulan una proteína de aproximadamente 96 kDa que es reconocida por el anticuerpo policlonal específico de la GFP que no aparece en plantas no transformadas (Figura 1). Las plantas transformadas fueron sometidas a análisis de la localización subcelular de la fluorescencia de GFP mediante un microscopio confocal D-Eclipse C1 (NIKON) equipado con un láser con excitación Ar 488, un filtro para emisión verde BA515/30, un filtro para emisión roja BA650LP y un detector de luz. En las fotografías de la Figura 2 puede observarse que la proteína GFP está localizada en los gránulos de almidón.

### Ejemplo 2

#### Purificación e identificación de la proteína GFP de las plantas transformadas con la construcción *GBSS-thromb-GFP*

##### Purificación de la proteína GFP a partir de plantas transgénicas

El protocolo para la purificación de la proteína GFP a partir de gránulos de almidón de plantas transformadas con *35S-GBSS-thr-GFP* se describe a continuación:

- 1 g de hojas de plantas transformadas con *35S-GBSS-thr-GFP* fue homogeneizado con una batidora en 10 ml de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.05% Tritón).
- El homogeneizado se filtró a través de dos capas de Miracloth y se dejó sedimentar a 4°C.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet enriquecido en almidón se resuspendió en 300 µl de tampón de digestión de trombina (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). 150 µl de esta suspensión fueron sometidos a digestión con 0.16 U de trombina durante 12 h a 22°C. Los restantes 150 µl de la suspensión fueron utilizados como control negativo.
- Finalizada la digestión con trombina la muestra se centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue sometido a electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE y a inmunodetección de GFP mediante inmunotransferencia haciendo uso de un anticuerpo primario anti-GFP.

*Identificación de la proteína GFP*

La identificación de GFP puede realizarse de cualquiera de las maneras siguientes: (a) mediante inmunoblots haciendo uso de anticuerpos específicos contra GFP y (b) mediante detección de la fluorescencia emitida por la proteína GFP.

*Por inmunotransferencia:* La detección de la GFP se llevó a cabo haciendo uso de un anticuerpo específico anti-GFP según la metodología de inmunotransferencia descrita en (Towbin *et al.* 1979). El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

*Por análisis de su fluorescencia mediante microscopía confocal.* Plantas de patata y *Arabidopsis* fueron transformadas con la construcción quimérica GBSS-thr-GFP obtenida según se ilustra en la Figura 4. Las plantas fueron sometidas a observación mediante microscopía confocal para identificar la localización subcelular de la fluorescencia de GFP (Figura 2).

Plantas de *N. benthamiana* fueron transformadas con la construcción quimérica *GBSS-thr-GFP* obtenida según el procedimiento ilustrado en la Figura 3 y en la Figura 4. Los gránulos de almidón obtenidos de estas hojas tras un paso de homogeneización y posterior centrifugación a baja aceleración fueron sometidos a la digestión con trombina para liberar la proteína GFP. Mediante un paso adicional de centrifugación se separó la proteína soluble GFP de los gránulos de almidón, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en proteína GFP. Para confirmar la liberación de GFP de los gránulos de almidón se realizó un inmunotransferencia usando un anticuerpo específico anti-GFP. Como se observa en la Figura 5, en el sobrenadante de la muestra tratada con trombina se detecta una proteína de aproximadamente 29 kDa que corresponde a la GFP liberada de los granos de almidón. Esta proteína no aparece cuando los granos de almidón no son tratados con trombina, lo cual indica que la liberación de la proteína unida a la GBSS tan solo tiene lugar en presencia de la proteasa trombina. En los gránulos de almidón insolubles, el anticuerpo anti-GFP reconoce una proteína de 96 kDa que corresponde a la proteína de fusión GBSS-trombina-GFP.

**Bibliografía**

- Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y. and Raskin I. (1999)** Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat. Biotechnol.* 17: 466-469.
- Clough S.J. and Bent A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-43.
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and Twyman R.M. (2004)** Plant based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 152-158.
- Giddings G. (2001)** Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 450-454.
- Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M.B. and Menassa R. (2010)** Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 152: 622-633.
- Ma J.K.C., Drake P. and Christou P. (2003)** The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Rev. Genet.* 4: 794-805.
- Markley N.A., Nykiforuk C.L., Boothe J.G. and Moloney M.M. (2006)** Producing proteins using transgenic oilbody-oleosin technology. *BioPharm International* 19: 34-57.
- Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W., Stratmann M., Schell J. and Willmitzer L. (1989)** Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatine gene. *EMBO J.* 8, 23-29.
- Schillberg S., Zimmermann S., Findlay K. and Fischer R. (2000)** Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to tobacco mosaic virus. *Mol. Breeding* 6: 317-326.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Twyman R.M., Schillberg S. and Fischer R. (2005)** Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 10: 185-218.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and Fischer R. (2003)** Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21: 570-578.
- Voinnet O., Pinto Y.M. and Baulcombe D.C. (1999)** Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14147-14152.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de proteínas heterólogas recombinantes purificadas, que comprende las siguientes etapas:

a) obtener una planta transgénica mediante transformación de una planta silvestre con un vector de expresión que comprende, en dirección 5'-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-di-quinasasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés.

b) cultivar la planta transgénica de la etapa a) en condiciones apropiadas para su crecimiento;

c) homogeneizar cualquier tejido de la planta que acumule almidón, seleccionado de: tubérculos, hojas, frutos y semillas;

d) centrifugar y seleccionar la fracción de densidad más elevada, que contiene las proteínas del gránulo de almidón;

e) tratar con la proteasa que reconoce el sitio de corte comprendido en la secuencia descrita en la etapa a);

f) centrifugar y purificar la proteína heteróloga a partir del sobrenadante, mediante cualquier técnica de separación por tamaños, inmunoabsorción, intercambio iónico o detección de fluorescencia.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el promotor descrito en la etapa a) es constitutivo.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho promotor es el promotor de RNA 35S.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína unida al gránulo de almidón descrita en la etapa a) es R1.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que, la proteína unida al gránulo de almidón descrita en la etapa a) es una enzima ramificadora de almidón, seleccionada del grupo formado por: BEI, BEIIa y BEIIb.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína unida al gránulo de almidón descrita en la etapa a) es la almidón-fosforilasa plastidial.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína unida al gránulo de almidón descrita en la etapa a) es una almidón-sintasa soluble seleccionada del grupo formado por: SSI, SSII y SSIII.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína unida al gránulo de almidón codificada, descrita en la etapa a) es la GBSS o una proteína con al menos un 60% de homología con la GBSS, que se une al gránulo de almidón.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la proteína unida al gránulo de almidón codificada, descrita en la etapa a) es la GBSS.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la secuencia reconocida específicamente por proteasa, descrita en la etapa a) es una secuencia reconocida por trombina.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la proteína recombinante de interés codificada, descrita en la etapa a) es la proteína verde fluorescente (GFP).

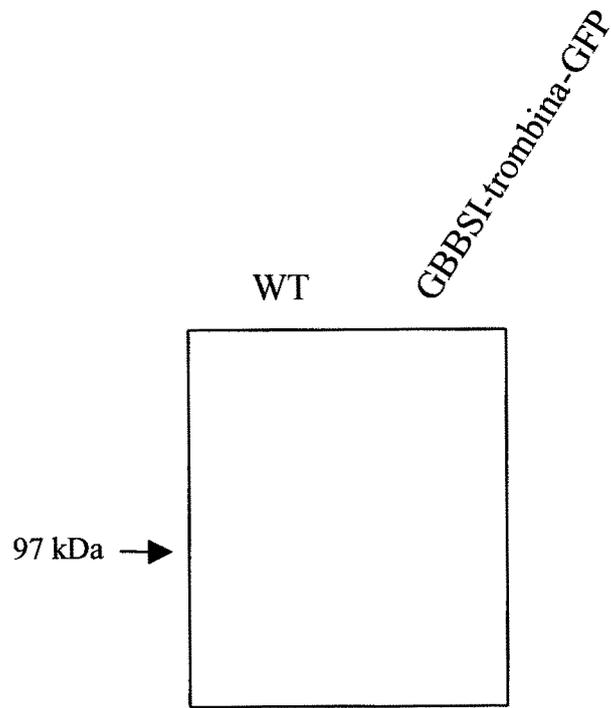
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la secuencia nucleotídica codificante de la etapa a) comprende la secuencia representada por SEQ ID N°: 1.

13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la secuencia nucleotídica codificante expresa un polipéptido purificado, cuya secuencia comprende la secuencia representada por SEQ ID N°: 2.

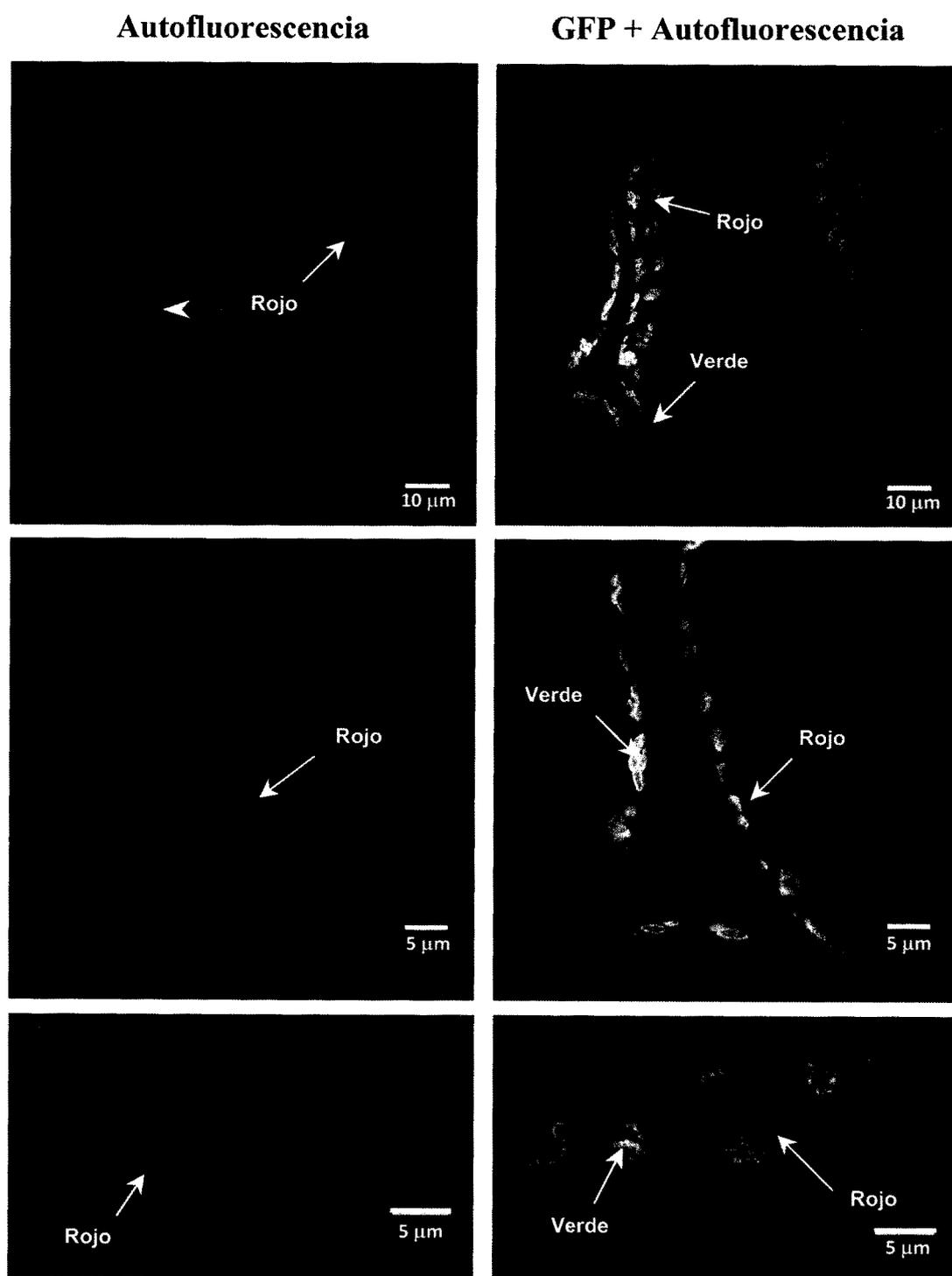
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que el vector utilizado en la etapa a) se obtiene partiendo del vector *pGWB2-GBSS gtw*, que comprende, en sentido 5'-3', el promotor de RNA 35S; una secuencia que codifica la GBSS y una secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attR1 y attR2; mediante incorporación en esta última secuencia, de una secuencia que codifica un sitio de corte de trombina seguido de una secuencia que codifica la GFP.

## ES 2 377 617 A1

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el vector pGWB2-GBSS gtw se introduce en un hospedador bacteriano.
- 5 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el hospedador es *E. coli*.
17. Procedimiento según las reivindicaciones 11-13, en el que el vector de expresión utilizado en la etapa a) es pGWB2-GBSS-Thr-GFP, que comprende, en sentido 5'-3-, el promotor de RNA 35S, una secuencia que codifica la GBSS; una secuencia que codifica un sitio de corte de trombina; y una secuencia que codifica la GFP.
- 10 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que el vector pGWB2-GBSS-Thr-GFP se introduce en un hospedador bacteriano.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho hospedador es *Agrobacterium tumefaciens*.
- 15 20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que la planta transgénica de la etapa a) pertenece a las especies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* o *Arabidopsis thaliana*.
21. Un vector para uso en el procedimiento de las reivindicaciones 9-20, que comprende, en sentido 5'-3-, un promotor, una secuencia que codifica la GBSS y una secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attR1 y attR2, el cual permite clonar aguas abajo de GBSS cualquier secuencia nucleotídica flanqueada por secuencias attL1 y attL2.
- 20 22. Vector según la reivindicación 21, en el que el promotor es el promotor de RNA 35S, que es el vector pGWB2 GBSS gtw.
- 25 23. Un organismo hospedador para uso en el procedimiento de las reivindicaciones 9-20, transformado con un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22.
24. Organismo hospedador según la reivindicación 23, transformado con el vector de la reivindicación 22, siendo dicho organismo la bacteria *E. coli*.
- 30 25. Un vector de expresión para uso en el procedimiento de las reivindicaciones 1-20, que comprende en dirección 5'-3': un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de almidón, seleccionada de: almidón-sintasa unida al gránulo de almidón (GBSS), glucano-diquinasa (R1), enzimas ramificadoras de almidón (BEI, BEIIa, BEIIb), almidón-sintasas solubles (SSI, SSII, SSIII) y almidón-fosforilasa plastidial; un sitio de corte de una proteasa; y una proteína de interés.
- 35 26. Vector según la reivindicación 25, en el que el promotor es el promotor de RNA 35S, la proteína unida al gránulo de almidón es la GBSS, la proteasa es trombina y la proteína de interés es la GFP, que es el vector pGWB2-GBSS-Thr-GFP.
- 40 27. Un organismo hospedador para uso en el procedimiento de las reivindicaciones 1-20, transformado con un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 25-26.
28. Organismo hospedador según la reivindicación 27, siendo dicho organismo una bacteria.
- 45 29. Organismo hospedador según la reivindicación 28, transformado con el vector de la reivindicación 26, siendo dicho organismo *Agrobacterium tumefaciens*.
30. Una célula vegetal transformada con el organismo hospedador de las reivindicaciones 27-29.
- 50 31. Una planta transgénica, sus semillas o material de propagación, cuyas células son las de la reivindicación 30.
32. Planta transgénica según la reivindicación 31, **caracterizada** porque su genoma lleva integrada la secuencia representada por SEQ ID N°: 1 y expresa la secuencia representada por SEQ ID N°: 2.
- 55 33. Planta transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 31-32, perteneciente a las especies *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* o *Arabidopsis thaliana*.
- 60
- 65



**Figura 1**



**Figura 2**

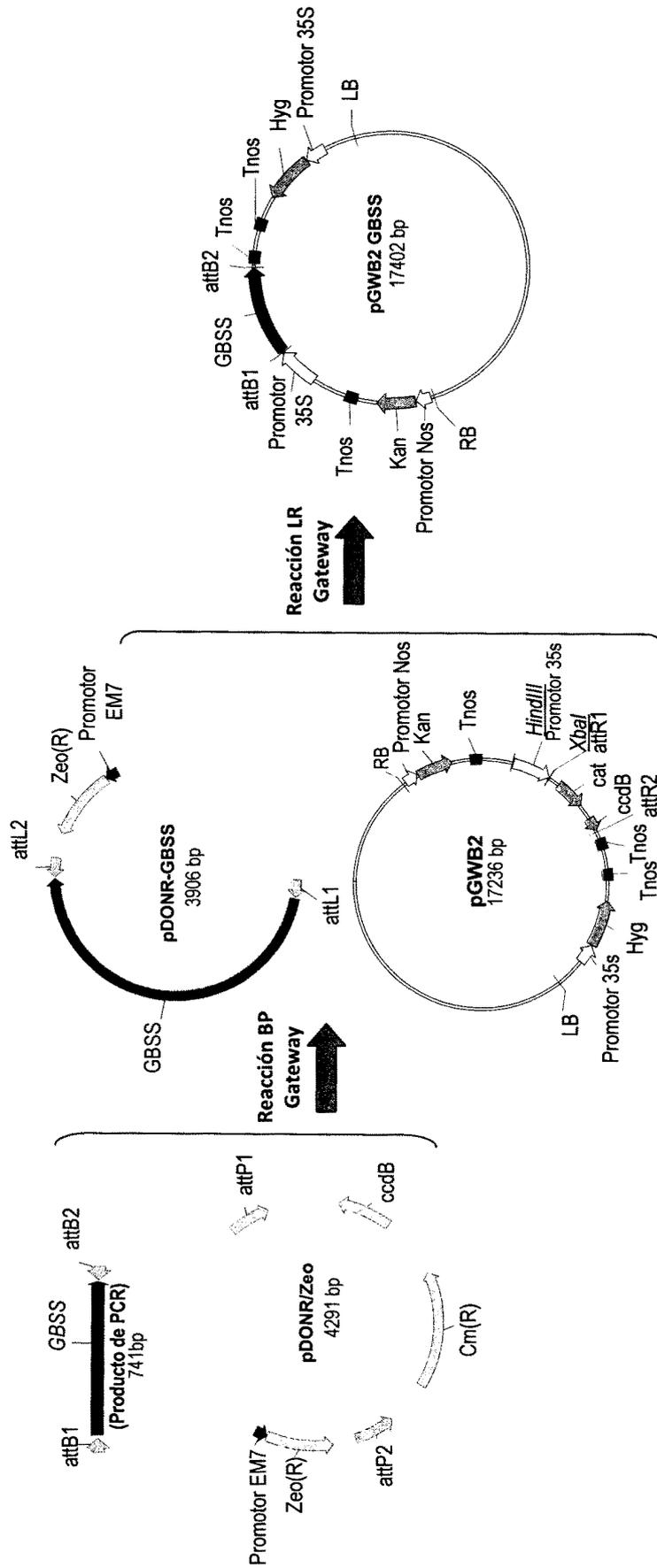


Figura 3A

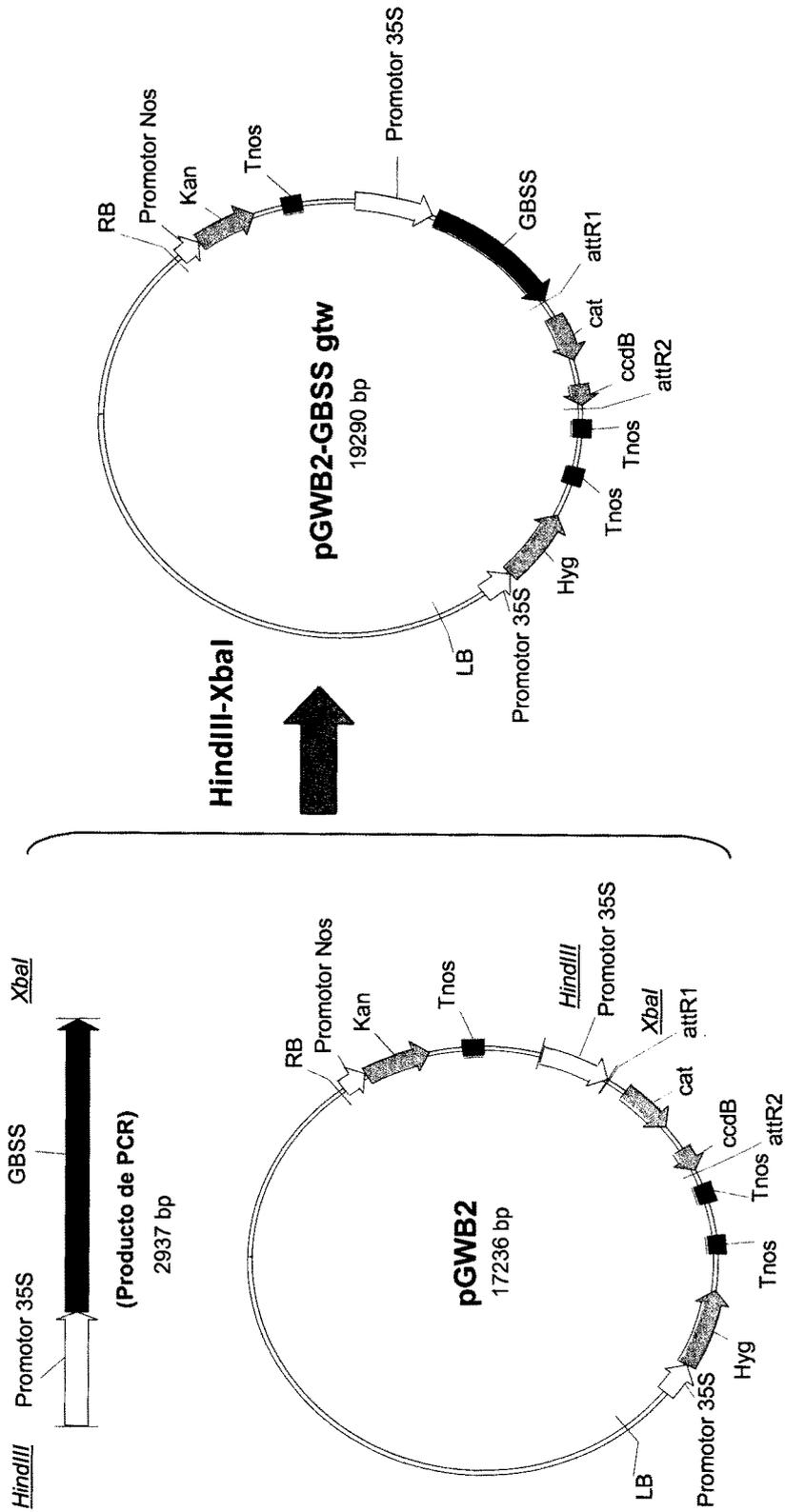


Figura 3B

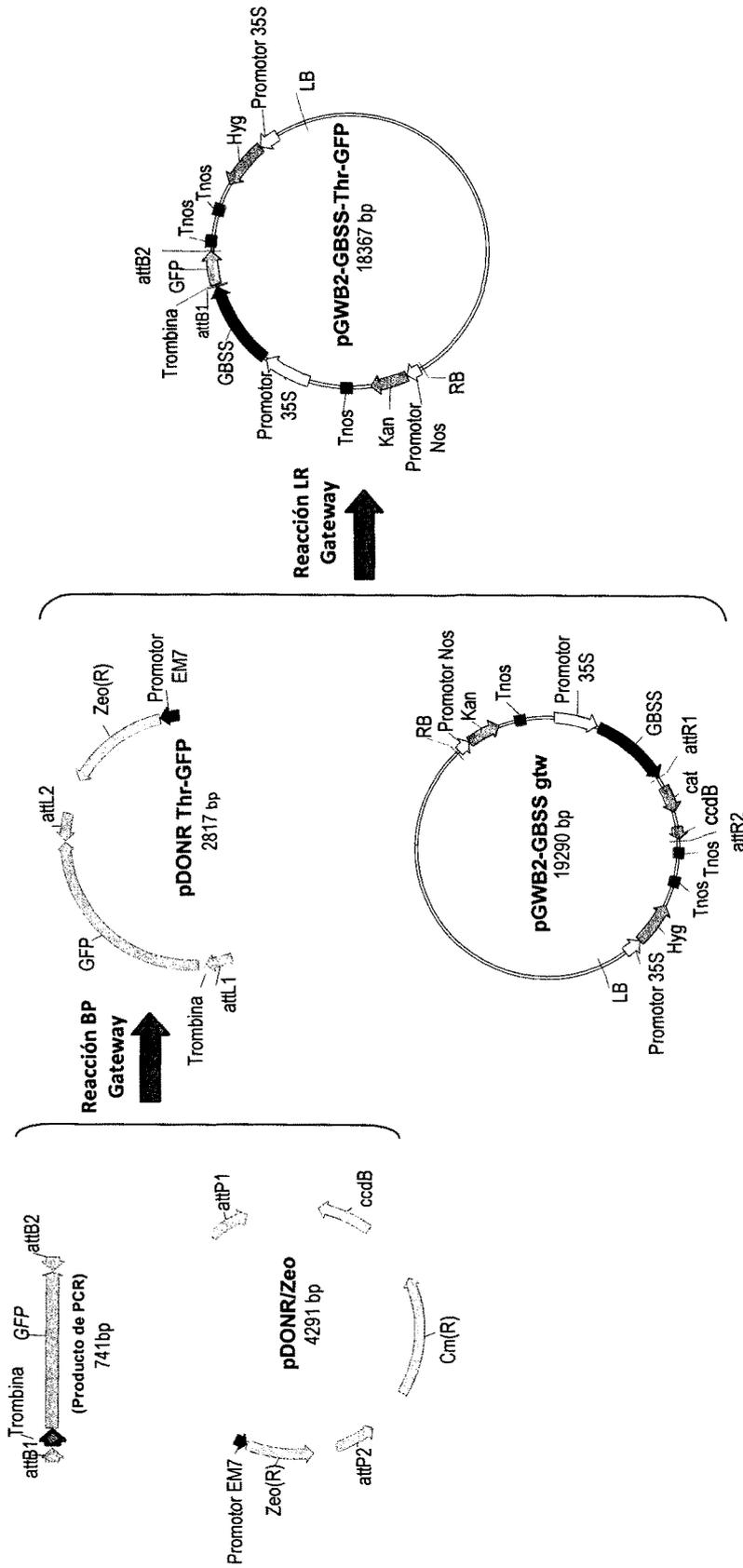
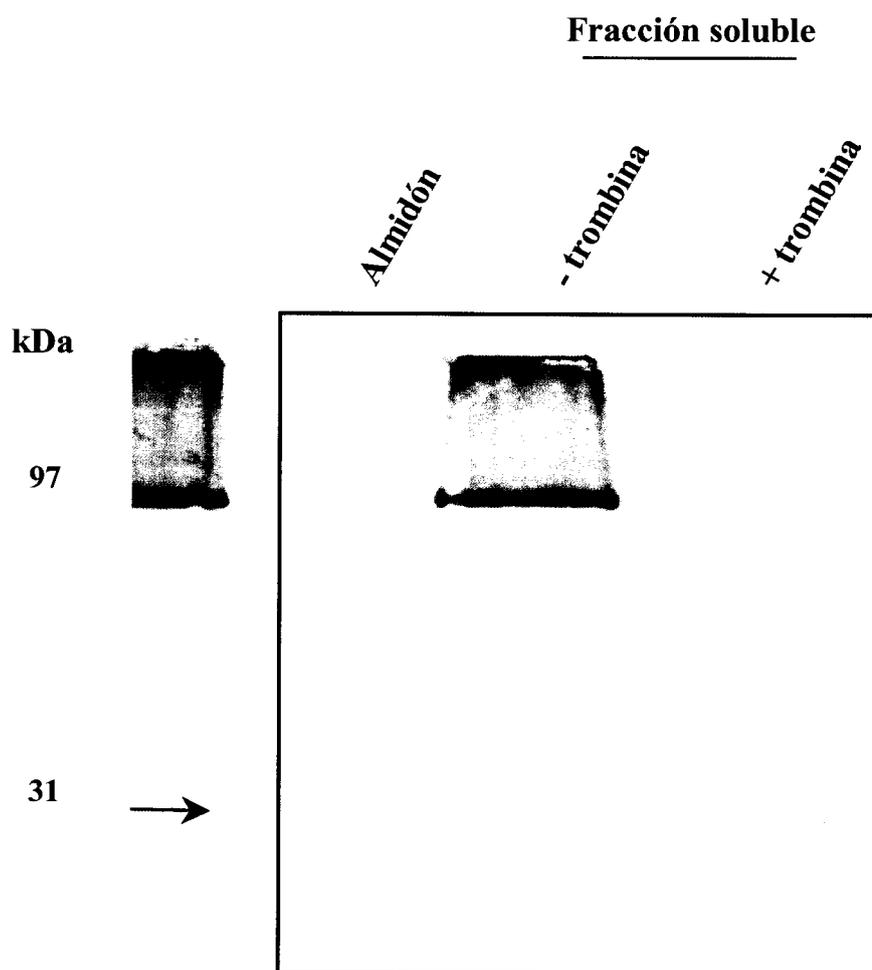


Figura 4



**Figura 5**

# ES 2 377 617 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEN BIOTECHNOLOGY, S.L.

5 <120> Procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas

<130> P-100995

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 2613

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Comprende secuencia codificadora de GBSS, vestigio del sitio de clonaje, sitio de corte de trombina y secuencia codificadora de GFP.

25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2613)

30

<223> Secuencia quimérica completa

<220>

<221> misc\_feature

35

<222> (1)..(1830)

<220>

40

<221> source

<222> (1)..(1830)

<223> *Arabidopsis thaliana*

45

<220>

<221> misc\_recomb

<222> (1831)..(1872)

<223> Vestigio del sitio de clonaje

50

<220>

<221> protein\_bind

<222> (1873)..(1893)

55

<223> Sitio de unión de trombina

<220>

60

<221> misc\_feature

<222> (1894)..(2613)

<223> Secuencia codificadora de GFP

65

<400> 1

atg gca act gtg act gct tct tct aac ttt gtg tca aga act tca ctt  
Met Ala Thr Val Thr Ala Ser Ser Asn Phe Val Ser Arg Thr Ser Leu  
1 5 10 15

48









## ES 2 377 617 A1

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

## ES 2 377 617 A1

	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe	Met	Asp	Gly	Tyr	Glu	Lys	Pro	Val	Lys	Gly	Arg
	290						295					300				
5	Lys	Ile	Asn	Trp	Met	Lys	Ala	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala	His	Arg	Val	Leu
	305					310					315					320
10	Thr	Val	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Glu	Leu	Ile	Ser	Gly	Val	Asp	Arg
					325					330					335	
15	Gly	Val	Glu	Leu	His	Lys	Tyr	Leu	Arg	Met	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Ile
				340					345					350		
20	Ile	Asn	Gly	Met	Asp	Val	Gln	Glu	Trp	Asn	Pro	Ser	Thr	Asp	Lys	Tyr
			355					360						365		
25	Ile	Asp	Ile	Lys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Lys	Pro	Leu
	370						375					380				
30	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Val	Asp	Arg	Asp
	385					390					395					400
35	Val	Pro	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Lys	Gly	Ser
					405					410					415	
40	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Ser	Lys	Phe	Met	Gly	Leu	Asn	Val	Gln
				420					425					430		
45	Met	Val	Ile	Leu	Gly	Thr	Gly	Lys	Lys	Lys	Met	Glu	Ala	Gln	Ile	Leu
			435					440						445		
50	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Phe	Pro	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Val	Ala	Lys	Phe
	450						455					460				
55	Asn	Val	Pro	Leu	Ala	His	Met	Ile	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Ile
	465					470					475					480
60	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Ile	Gln	Leu	His	Ala	Met
				485						490					495	
65	Arg	Tyr	Gly	Thr	Val	Pro	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Gly	Gly	Leu	Val	Asp
				500					505					510		
70	Thr	Val	Lys	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Phe	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Asn	Val
			515					520					525			

## ES 2 377 617 A1

	Lys	Cys	Glu	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	Ala
	530						535					540				
5	Val	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Val	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ala	Met	Gln	Glu	Met
	545					550					555					560
10	Val	Lys	Asn	Cys	Met	Asp	Gln	Asp	Phe	Ser	Trp	Lys	Gly	Pro	Ala	Arg
					565					570					575	
15	Leu	Trp	Glu	Lys	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Asn	Val	Ala	Gly	Ser	Glu	Ala
				580					585					590		
20	Gly	Thr	Glu	Gly	Glu	Glu	Ile	Ala	Pro	Leu	Ala	Lys	Glu	Asn	Val	Ala
			595					600					605			
25	Thr	Pro	Ser	Leu	Glu	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Tyr	Lys	Lys	Ala	Gly	Leu
		610					615					620				
30	Met	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe
	625					630					635					640
35	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly
					645					650					655	
40	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly
				660						665				670		
45	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro
			675					680					685			
50	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser
		690						695				700				
55	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met
	705					710					715					720
60	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly
					725					730					735	
65	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val
				740					745					750		
70	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile
			755					760					765			
75																

## ES 2 377 617 A1

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile  
770 775 780

5 Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg  
785 790 795 800

10 His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln  
805 810 815

15 Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr  
820 825 830

20 Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp  
835 840 845

25 His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly  
850 855 860

30 Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
865 870

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001115

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.08.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K1/14** (2006.01)  
**C07K1/36** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 6982083 B1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 03.01.2006, columnas 3,4,6-8,13,26,69.	1-3,8-11,20,23-25, 27-31,33
Y	WO 9814601 A1 (EXSEED GENETICS L.L.C.) 09.04.1998, página 8.	1-3,8-11,20,23-25, 27-31,33
A	WO 0077165 A2 (LANDBOUWUNIVERSITEIT WAGENINGEN) 21.12.2000	1-33
A	WO 9814601 A1 (EXSEED GENETICS L.L.C.) 09.04.1998	1-33

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  
30.01.2012

Examinador  
I. Rueda Molins

Página  
1/4

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

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, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.01.2012

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-33	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 4-7, 12-19, 21, 22, 26, 32	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 8-11, 20, 23-25, 27-31 y 33	<b>NO</b>

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	US 6982083 B1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE)	03.01.2006
D02	WO 9814601 A1 (EXSEED GENETICS L.L.C.)	09.04.1998
D03	WO 0077165 A2 (LANDBOUWUNIVERSITEIT WAGENINGEN)	21.12.2000
D04	WO 9814601 A1 (EXSEED GENETICS L.L.C.)	09.04.1998

**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 procedimiento para la producción y purificación de proteínas recombinantes en plantas.

Los documentos D01, D02, D03 y D04 muestran diferentes proteínas de fusión.

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)**

Las reivindicaciones 1-3, 8-11 y 20 reivindican un procedimiento de obtención de proteínas heterólogas recombinantes purificadas, que comprende las siguientes etapas: A) Obtener una planta transgénica mediante transformación de una planta silvestre con un vector de expresión que comprende, en dirección 5'-3' un promotor unido a una secuencia nucleotídica que codifica: una proteína unida al gránulo de almidón, un sitio de corte de una proteasa y una proteína de interés. B) Cultivar dicha planta transgénica. C) Homogeneizar cualquier tejido de la planta que acumule almidón. D) Centrifugar y seleccionar la fracción de densidad más elevada. E) Tratar con una proteasa que reconozca el citado sitio de corte. F) Centrifugar y purificar la proteína heteróloga.

Las reivindicaciones 23-25, 27-29 reivindican un organismo hospedador y un vector para ser empleado en el procedimiento reivindicado.

Las reivindicaciones 30, 31 y 33 reivindican una célula y una planta transformada con dicho organismo hospedador.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga (en la reivindicación 1) una proteína de fusión que comprende en el extremo amino la enzima GBSSI y en el extremo carboxilo la proteína de interés. En el documento se indica (en la columna 6) como está proteína de fusión además puede contener un sitio de corte de una proteasa situado entre la enzima y la proteína de interés. Además (como se divulga en la columna 26 del citado documento) la expresión de la proteína de fusión puede estar dirigida por un promotor que permite la expresión en plantas seguido de un péptido de tránsito del citosol al cloroplasto. El documento D01 también indica (en la columna 26) cómo se pueden obtener plantas transformadas con el péptido de fusión para posteriormente extraer el almidón y purificar la proteína de interés. En dicho documento no se detalla en el procedimiento de purificación el empleo de una proteasa, para que reconozca el sitio de corte que comprende la proteína de fusión. El uso de una proteasa, con el fin de que reconozca el sitio de corte que comprende dicha proteína, resultaría evidente para un experto en la materia, a partir del conocimiento general del estado de la técnica o teniendo en cuenta la información divulgada en (la página 8) del documento D02.

Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-3, 8-11, 20, 23-25, 27-31 y 33 presentan novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.