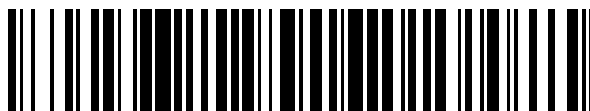


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 179**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07725584 .2**
96 Fecha de presentación: **25.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2029751**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Sistema de expresión inducible basado en virus de plantas**

30 Prioridad:
29.05.2006 EP 06011002
02.06.2006 US 810398 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2012

73 Titular/es:
ICON GENETICS GMBH
BRIENNERSTRASSE 12A
80333 MÜNCHEN, DE

72 Inventor/es:
WERNER, Stefan;
MARILLONNET, Sylvestre;
KLIMYUK, Victor y
GLEBA, Yuri

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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

ES 2 382 179 T3

DESCRIPCIÓN

Sistema de expresión inducible basado en virus de plantas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un proceso de producción o expresión de una o más de una proteína de interés en plantas o células de planta usando un sistema de expresión viral. La invención se relaciona además con plantas o células de plantas, especialmente plantas o células de plantas transgénicas, para este proceso. La invención también proporciona un proceso para producir las plantas o células de plantas de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La expresión de alto rendimiento de proteínas heterólogas en plantas puede en principio ser lograda usando vectores virales. Sin embargo, a pesar de la existencia de diferentes sistemas de expresión viral de plantas, los sistemas de expresión viral de plantas son predominantemente usados para la expresión transitoria de una proteína de interés en plantas después de una infección (Donson et al., 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88:7204-7208; Chapman, Kavanagh & Baulcombe, 1992, Plant J., 2:549-557) o transfección (Marillonnet et al., 2005, Nat. Biotechnol., 23:718-723; Santi et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:861-866; WO2005/049839) de una planta anfitriona con un vector viral recombinante. A pesar de las diferentes publicaciones científicas y solicitudes de patente publicadas, no existen aún sistemas de producción basados en virus comerciales establecidos disponibles que pudieran facilitar el escalamiento ascendente y proporcionar un alto rendimiento, predominantemente debido a dos razones principales:

Primera, los sistemas de expresión basados en virus de plantas transitorios se restringen generalmente a anfitriones específicos los cuales pueden no ser adecuados para el cultivo a gran escala debido a su susceptibilidad a factores ambientales. Además, ellos se restringen generalmente a ciertas partes de una planta anfitriona, excluyendo de este modo la mayoría de la biomasa de la planta del proceso de producción y como resultado minimiza el rendimiento relativo de producto recombinante por unidad de biomasa de planta a un nivel bajo comparable con el logrado usando promotores de transcripción convencionales en una planta transgénica;

Segunda, los intentos por escalar de manera ascendente de los sistemas de producción basados en virus generando plantas anfitrionas transgénicas que tienen el replicón viral integrado de manera estable en cada célula no proporcionan una solución, en particular debido al subdesempeño de los replicones en esa posición y debido a que la formación constante de replicones virales comprende el crecimiento y desarrollo de la planta. Usualmente, los vectores virales sistémicos en sistemas de expresión transitorios pueden tolerar insertos relativamente cortos (de hasta un kb) de ácidos nucleicos heterólogos siendo de este modo restringidos a la expresión de proteína relativamente pequeñas. Los vectores virales usados para la transfección (liberación mediada por *agrobacterium*, WO2005/049839) pueden expresar insertos más grandes, pero requieren agroinfiltración de plantas completas. Obviamente, esos sistemas son convenientes para la producción de muchas proteínas recombinantes incluyendo antígenos, puesto que requieren un tiempo breve para emplearse y escalarse ascendentemente, pero las versiones transgénicas de sistemas de expresión basados en vectores podrían ser una ventaja en muchas otras aplicaciones. Especialmente, éste es un problema para la producción de proteínas recombinantes requeridas en grandes cantidades y a un costo relativamente bajo (por ejemplo diferentes celulasas y otras enzimas técnicas) donde el sistema de expresión transitorio basado en la agro-infiltración (WO2005/049839) podría no ser económicamente viable. La expresión de un vector viral en plantas anfitrionas transgénicas es usualmente dañina para el crecimiento y desarrollo de la planta. También, esa expresión eventualmente conducirá al silenciamiento del transgen. Para encontrar una solución a este problema, se intentó liberar un replicón viral silenciado de cromosomas de planta con la ayuda de supresores del silenciamiento de genes postranscripcionales (PTGS) (US6395962; Mallory et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:622-625). Un sistema de expresión inducible por glucocorticoides basado en un ARN virus tripartita de planta (Mori et al., 2001, Plant. J., 27, 79-86), Virus de Mosaico de Brome (BMV), dio quizá debido al PTGS, un rendimiento muy bajo de la proteína de interés (3-4 µg/g de peso fresco), el cual es comparable con los rendimientos proporcionados por promotores transcripcionales estándar (no virales).

Actualmente no existe un sistema de expresión viral de plantas a gran escala, el rendimiento y eficiencia del cual sea suficientemente alto para competir en el mercado con otros sistemas de expresión a gran escala como sistemas de expresión bacterianos, micóticos o células de insecto. Esa expresión en plantas tendría que satisfacer los siguientes criterios también como sea posible:

(i) alto rendimiento, incluyendo la expresión de la proteína de interés en tantos tejidos de planta como sea posible y en muchas células de los tejidos;

(ii) prevenir un efecto dañino de la expresión de la proteína sobre la sobrevivencia de las células de planta, la

expresión de la proteína o producto de interés deberá comenzar en todas las células de planta de la planta tratada o tejido de planta al mismo tiempo.

Típicamente, la proteína o producto de interés se acumula con cada célula produciendo el producto o proteína hasta un cierto punto. Durante la acumulación, sin embargo, los procesos degradantes frecuentemente son los que tienden a reducir el rendimiento o calidad de la proteína o producto de interés. Por lo tanto, existe un punto óptimo en el tiempo, donde el producto o proteína de interés deberá ser cosechado. Este punto óptimo en el tiempo deberá ser alcanzable en todos los tejidos o células de una planta y en todas las plantas de un lote seleccionado al mismo tiempo para hacer el proceso total eficiente y redituable.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar un proceso de expresión de una o más proteínas en un sistema de planta que es fácilmente capaz de aplicaciones a gran escala, da un alto rendimiento de una proteína a ser expresada, y, al mismo tiempo, es biológicamente seguro dado que la probabilidad de expresión descontrolada de la proteína recombinante de interés es baja. Es además un objetivo de la invención proporcionar un método eficiente de producción de plantas transgénicas que codifican para un replicón viral adecuado para una expresión de una proteína de interés del replicón viral.

De este modo, la invención proporciona un proceso para producir una o más de una proteína de interés, que comprende:

(a) proporcionar una planta o células de planta que comprende:

una primera secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN, y un primer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN;

el replicón de ARN no codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta;

el replicón de ARN que codifica para una polimerasa y una o más de una proteína de interés, estando la polimerasa adaptada para replicar el replicón de ARN; e

(b) inducir, en la planta o células de planta del paso (a), el promotor inducible, produciendo, por lo tanto una o más de una proteína de interés en la planta o células de planta.

La invención proporciona además un proceso para producir una o más de una proteína de interés que comprende:

(a) proporcionar una planta que comprende

(i) una primera secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN, y un primer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN;

el replicón de ARN no codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta;

el replicón de ARN que codifica para una polimerasa y una o más de una proteína de interés, estando la polimerasa adaptada para replicar al replicón de ARN; y

(ii) una segunda secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN, donde la segunda secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segundo promotor inducible ligado operativamente a la secuencia que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN; e

(b) inducir, en la planta del paso (a), el primer y segundo promotor inducibles produciendo por lo tanto una o más de una proteína de interés en la planta.

La invención proporciona además plantas o células de planta proporcionadas en los pasos (a) de los procesos anteriores. La invención proporciona además un proceso para producir una planta o célula de planta de la invención, que comprende introducir en un cromosoma nuclear de planta la primera secuencia nucleotídica heteróloga y opcionalmente la segunda secuencia nucleotídica heteróloga, seguido por la generación de una planta transformada que contiene la primera y, opcionalmente, la segunda secuencia nucleotídica heteróloga.

Los inventores de la presente invención han encontrado, de manera sorprendente un proceso para producir una o más de una proteína de interés en plantas o células de plantas que alcanzan niveles de expresión que no habían sido alcanzables en la técnica anterior. Al mismo tiempo, el proceso de la invención es biológicamente seguro y escalable a nivel industrial. Los niveles de expresión excepcionales de la invención son logrados por medio de un sistema de expresión viral que evita respuestas antivirales por la planta o células de planta como el silenciamiento del transgen en el grado hasta ahora desconocido. En la invención, la liberación del replicón de ARN de la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica para el replicón de ARN y la expresión de la proteína que permite el movimiento

célula a célula del replicón de ARN son controladas por promotores inducibles. Cualquier liberación no pretendida del replicón de ARN debido a la transcripción descontrolada del replicón de ARN de la secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN se confina a aquellas células en las cuales la transcripción descontrolada ha ocurrido, puesto que el replicón de ARN no es capaz del movimiento célula a célula en la planta o en las células de planta en ausencia de la proteína que proporciona el movimiento célula a célula. De manera importante no son expresadas secuencias virales en el estado no inducido a un nivel capaz de activar el silenciamiento del transgen. Por lo tanto, es poco probable que ocurra el silenciamiento del transgen. Además, los efectos dañinos sobre el rendimiento de la expresión del replicón de ARN omitiendo una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta es compensado proporcionando una secuencia que codifica una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN en el tránsito hacia el replicón de ARN. La proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN es expresada bajo el control de un promotor inducible. Esto preserva el confinamiento de la expresión descontrolada del replicón viral a células donde ha ocurrido la expresión descontrolada y evita el silenciamiento del gen, pero permite altos niveles de expresión de la proteína de interés en el estado inducido. De este modo, en la invención, los efectos dañinos del silenciamiento del gen sobre el rendimiento de la proteína de interés están esencialmente ausentes.

Además, los inventores han encontrado de manera sorprendente que la eficiencia de transformación cuando son transformadas células de planta con la primera secuencia nucleotídica heteróloga de la invención es mayor que en un caso donde un replicón de ARN codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula. En algunos casos, no fue posible del todo obtener transformantes primarios con la primera secuencia nucleotídica heteróloga, si un replicón de ARN codificada para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula. Este Efecto de la invención de mejorar la eficiencia de la transformación puede deberse a la incapacidad del replicón de ARN de la invención para el movimiento célula a célula.

En una modalidad de la invención, la planta o células de planta contienen una segunda secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN, donde la segunda secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segundo promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN. Esta modalidad de la invención permite incrementar aún más el rendimiento de producción de una o más de una proteína de interés.

En el paso (a) del proceso de producción de una o más de una proteína de interés, una planta o células de planta son provistas con la primera secuencia nucleotídica heteróloga. La planta o células de planta son provistas con la primera secuencia nucleotídica heteróloga de modo que se obtenga una planta transgénica o células de planta transgénica. En una modalidad, la planta transgénica o células de planta transgénica contienen la primera secuencia nucleotídica heteróloga en un cromosoma nuclear.

La planta o células de planta también pueden ser provistas con la segunda secuencia nucleotídica heteróloga de modo que se obtenga una planta transgénica o células de plantas transgénicas. En una modalidad, la planta transgénica o las células de planta transgénica contienen la segunda secuencia nucleotídica heteróloga en un cromosoma nuclear.

Generar plantas transgénicas que contengan una secuencia nucleotídica heteróloga integrada de manera estable en un cromosoma nuclear o episomalmente es conocido en la técnica. Típicamente, la secuencia nucleotídica heteróloga contendrá un gen marcador seleccionable para seleccionar células de plantas o tejido de planta que tengan integrada la secuencia nucleotídica heteróloga. Las plantas transgénicas completas que contienen la secuencia nucleotídica heteróloga en células de la planta transgénica pueden entonces ser regeneradas a partir de células o tejido transformado usando procedimientos estándar en la técnica de la biotecnología de plantas. Las secuencias nucleotídicas heterólogas de la invención son típicamente ADN.

Si van a ser proporcionadas plantas que contengan la primera y segunda secuencias nucleotídicas heterólogas, la primera y segunda secuencias nucleotídicas heterólogas pueden ser parte de una secuencia nucleotídica heteróloga grande que sea usada para transformar células de planta o plantas. En esta modalidad, la secuencia nucleotídica heteróloga grande comprende la primera y segunda secuencias nucleotídicas heterólogas. De manera alternativa, una primera planta que contenga una primera secuencia nucleotídica heteróloga y una segunda planta que contenga la segunda secuencia nucleotídica heteróloga pueden ser generadas independientemente. La primera y segunda plantas pueden entonces ser cruzadas (por ejemplo por cruce sexual o por fusión celular) para obtener una planta que comprenda la primera y segunda secuencias nucleotídicas heterólogas. En una alternativa más, una planta transgénica o células de planta que contengan la primera secuencia nucleotídica heteróloga pueden ser transformadas con la segunda secuencia nucleotídica heteróloga para producir plantas o células de planta que contengan la primera y segunda secuencias nucleotídicas heterólogas, o una planta transgénica o células de planta que contengan la segunda secuencia nucleotídica heteróloga pueden ser transformadas con la primera secuencia nucleotídica heteróloga para producir plantas o células de plantas que contengan la segunda y primera secuencias nucleotídicas heterólogas. Aquí, "heteróloga" significa heteróloga con respecto a la planta.

La primera secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segmento de secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN. La primera secuencia nucleotídica heteróloga comprende además, un primer promotor inducible ligado operativamente al segmento de secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN. El promotor inducible permite inducir la transcripción del segmento de secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN en el paso (b) del proceso de la invención. La transcripción libera el replicón de ARN del segmento de secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN. El replicón de ARN es un replicón a nivel del ARN. El replicón de ARN producido en los núcleos de células de planta puede entonces migrar hacia el citosol donde las proteínas codificadas por el replicón de ARN pueden ser producidas y donde el replicón de ARN puede ser replicado o reproducido.

El replicón de ARN que codifica para proteínas que pueden ser expresadas después de que el replicón de ARN ha sido liberado por la inducción del promotor inducible. En la presente invención, el primer replicón de ARN codificado por la primera secuencia nucleotídica heteróloga es una secuencia de ARN que codifica para una polimerasa para replicar la secuencia de ARN, por lo que la secuencia de ARN está adaptada para ser replicada por la polimerasa codificada por éste. La polimerasa de este modo es una ARN polimerasa dependiente del ARN que también es definida aquí como "replicasa". El replicón de ARN preferiblemente tiene secuencias para traducir la polimerasa y secuencias para unir la polimerasa para permitir la replicación del replicón de ARN en células de la planta o células de planta. El replicón de ARN codifica además para una o más de una proteína de interés a ser expresada así como secuencias requeridas para expresar una o más proteínas de interés como promotores subgenómicos, mejoradores de la transcripción o mejoradores de la traducción.

En una modalidad preferida, el replicón de ARN es derivado de un ARN virus, como un ARN virus monopartita. "Monopartita" significa que el virus monopartita tiene un genoma que consiste de una molécula de ácido nucleico. De este modo, el replicón de ARN de la invención es preferiblemente un replicón de ARN monopartita, es decir, que consiste de un solo tipo de molécula de ARN. En una modalidad preferida, el replicón de ARN se deriva de un ARN virus de una sola hebra de sentido positivo, puesto que esos virus contienen los elementos genéticos requeridos para la replicación y expresión y son optimizados por evolución para el propósito de la invención. En la modalidad preferida, el replicón de ARN es un replicón de ARN de una sola hebra de sentido positivo.

"Se deriva" significa que aquellos elementos genéticos de los ARN virus requeridos para la invención son usados, mientras que otros pueden ser suprimidos o transformados en disfuncionales. En la invención, una secuencia que codifica para la proteína que proporciona movimiento célula a célula del virus será suprimida o transformada de manera disfuncional, por ejemplo, por supresión o mutación parcial de porciones de la secuencia esenciales para el movimiento célula a célula. De manera alternativa, una secuencia que codifique para una proteína de interés puede reemplazar a una secuencia que codifique para la proteína para el movimiento célula a célula completa o parcialmente. "Se deriva" implica que las secuencias del replicón de ARN tomadas de un virus de planta no tienen que ser idénticas a las secuencias de ARN correspondientes del ARN virus, sino que por ejemplo, pueden tener mutaciones adecuadas o pueden exhibir diferencias conservativas de función como intrones insertados en una porción de la secuencia que codifica para la replicasa como se describe en la WO 2005/049839. Puesto que las diferencias son conservativas de la función, las secuencias preferiblemente codifican para proteínas capaces de llevar a cabo funciones de replicón igualmente que lo hacen en los ARN virus de los cuales se derivó el replicón de ARN. Los ARN virus de una sola hebra de sentido positivo adecuados de los cuales el replicón de ARN de la invención, o la polimerasa del mismo, pueden derivarse son el virus del mosaico del tabaco (TMV) o virus X de la patata. Virus de plantas adicionales de los cuales pueden derivarse el replicón de ARN se dan más adelante. Sin embargo, también es posible sintetizar el replicón de ARN, o un ADNc que codifique para éste, artificialmente, por lo que pueden o no ser usados elementos genéticos de virus naturales.

El replicón de ARN de la invención no tiene que ser codificado por un segmento de secuencia nucleotídica continua de la primera secuencia nucleotídica heteróloga. En su lugar, la primera secuencia nucleotídica heteróloga puede tener dos o más segmentos de secuencia que juntos codifiquen para el replicón de ARN. Dos o más segmentos de esa secuencia pueden estar contiguos o pueden estar interrumpidos por otra porción de la secuencia. La formación del replicón de ARN en las células de planta puede entonces implicar recombinación de ADN o ARN específica del sitio. En el caso de la recombinación de ARN, el replicón de ARN puede ser formado vía la escisión de una porción de la secuencia que bloquee al replicón de ARN para que sea expresado. De manera alternativa, uno de dos o más segmentos de secuencia que codifiquen para el replicón de ARN discontinuamente puede ser modificado por recombinación, formando por lo tanto un solo segmento de secuencia continua que codifica para el replicón de ARN. También, es posible que el replicón de ARN pueda ser formado por recombinación entre dos precursores del replicón, ninguno de los cuales es un replicón de ARN. Esa recombinación puede ser un trans-empalme mediado por ribozima como se describe en la WO02/097080.

El replicón de ARN de la invención no codifica para una proteína que proporcione el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta. Esta característica de la invención permite confinar cualquier liberación descontrolada del replicón de ARN a la célula de planta de liberación descontrolada. Una proteína que proporciona movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta es generalmente referida como "proteína de movimiento". Los virus

de plantas usualmente codifican para y expresan una o más proteínas para permitir la propagación del virus o del ARN genómico del virus de célula a célula. El replicón de ARN de la invención no debe ser capaz de expresar una proteína de movimiento que permita que el replicón de ARN se disperse significativamente de célula a célula en la planta. La planta o la célula de planta no deberá expresar una proteína que proporcione al movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta, a menos bajo el control de un promotor inducible. En una modalidad, el replicón de ARN puede contener una parte de una proteína de movimiento de un ARN virus natural, siempre que parte de la proteína del movimiento no permita que el replicón de ARN se propague significativamente de célula a célula en la planta.

En una modalidad del proceso y planta de la invención, la planta comprende una segunda secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN, donde la segunda secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segundo promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN. La proteína puede ser derivada del mismo ARN virus de planta del cual se derivó la polimerasa del replicón de ARN o de otro ARN virus.

La secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN y la secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula están bajo el control de promotores inducibles separados para evitar la expresión descontrolada de un promotor inducible conduzca a la expresión de una proteína de movimiento y a la formación del replicón de ARN. De este modo, la secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN y la secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula están presentes en la planta o células de planta en diferentes casetes de expresión. Sin embargo, esos promotores inducibles separados no necesitan ser diferentes tipos de promotores inducibles. Los promotores inducibles separados pueden ser del mismo tipo y pueden tener la misma secuencia.

El promotor inducible del primero, segundo o cualquier promotor inducible adicional puede ser inducible por la misma o por una señal o agentes inductores diferentes. Los promotores inducibles que pueden ser usados en la presente invención se dan más adelante. En una modalidad, el promotor inducible de la primera y/o la segunda secuencia nucleotídica heteróloga son químicamente inducibles. En otra modalidad, el promotor inducible de la primera y/o la segunda secuencia nucleotídica heteróloga (y opcionalmente de secuencias nucleotídicas heterólogas adicionales) son inducibles por el mismo agente inductor como por IPTG, etanol, tetraciclina o glucocorticoides.

En el paso (b) del proceso de la invención, el promotor inducible en la planta o células de planta del paso (a) es inducible, comenzando por lo tanto la expresión de una o más de una proteína de interés, produciendo por lo tanto una o más de una proteína de interés en la planta o células de planta. El modo de inducción depende del tipo de promotor inducible. Si el promotor inducible es químicamente inducible, un agente químico capaz de inducir el promotor es proporcionado a la planta o las células de planta. Si son usados diferentes promotores inducibles por la primera y la segunda secuencia nucleotídica heteróloga, los diferentes agentes químicos pueden ser aplicados de manera concomitante a la planta o las células de planta, por ejemplo como una mezcla de diferentes agentes inductores. Si el proceso es llevado a cabo en células de planta en cultivo líquido, los agentes inductores pueden ser agregados al medio de cultivo. Si el proceso se lleva a cabo en una planta, los agentes inductores pueden ser aplicados a la planta rociando las plantas con una solución o suspensión de agentes inductores.

El proceso de la invención puede ser usado para producir una proteína de interés o más de una proteína de interés. Si va a ser producida una proteína de interés, puede ser incluida una secuencia nucleotídica que codifique para la proteína de interés en la secuencia nucleotídica que codifique para el replicón de ARN. En una modalidad, una secuencia nucleotídica que codifique para la proteína de interés puede reemplazar un gen de proteína de movimiento de un ARN virus de planta del cual se deriva el replicón de ARN. De manera alternativa, es posible reemplazar un gen de proteína de recubrimiento de un ARN virus del cual se derive el replicón de ARN por una secuencia nucleotídica que codifique para una proteína de interés. Si dos proteínas de interés van a ser expresadas, es posible reemplazar (completa o parcialmente) ambos de un gen de proteína de movimiento y un gen de proteína de recubrimiento por una secuencia nucleotídica que codifique para una proteína de interés.

Si van a producirse dos o más proteínas de interés, la planta o células de planta pueden comprender una tercera secuencia nucleotídica heteróloga que comprenda una secuencia nucleotídica que codifique para un replicón de ARN adicional y un tercer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia que codifique para el replicón de ARN adicional. El replicón de ARN adicional preferiblemente no codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN ni del replicón de ARN adicional en la planta. El replicón de ARN adicional puede entonces codificar para una o más proteínas adicionales de interés. Si la planta codifica para dos o más replicones de ARN, una proteína que permita el movimiento célula a célula del replicón de ARN puede también permitir el movimiento célula a célula del replicón de ARN adicional. De manera alternativa, el movimiento célula a célula del replicón de ARN adicional puede ser permitido por otra proteína que permita el movimiento célula a célula del replicón de ARN adicional, la expresión del cual puede estar bajo el control de un promotor inducible adicional. El replicón de ARN adicional puede ser replicable o reproducible por la polimerasa codificada por el replicón de ARN

codificado por la primera secuencia nucleotídica heteróloga. En una modalidad, sin embargo, el replicón de ARN adicional codifica para una polimerasa adicional para replicar el replicón de ARN adicional, por lo que la polimerasa adicional puede ser diferente del replicón de ARN.

5 En una modalidad, el replicón de ARN y el replicón de ARN adicional no son replicones de ARN que compitan. La producción de proteína de replicones de ARN que no compiten o vectores virales que no compiten se describe en la WO 2006/79546 (PCT/EP2006/000721).

10 Una o más de una proteína de interés puede ser purificada después de la producción de la planta o células de planta de los componentes celulares no deseados. Los métodos de purificación de proteínas de plantas o células de plantas son conocidos en la técnica. En un método, una proteína de interés puede ser dirigida al apoplasto de planta como se describe en la WO 03/020938.

15 La presente invención puede en principio ser aplicada a cualesquier plantas para las cuales existan ARN virus infecciosos y para las cuales se establecieron sistemas de vectores virales. En una modalidad, son usadas plantas dicotiledóneas para practicar la invención. En otra modalidad, son usadas plantas Solanaceae. Las plantas preferidas son especies de *Nicotiana* como *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*; plantas preferidas de especies diferentes a especies de *Nicotiana* son *Petunia hybrida*, *Brassica campestris*, *B. juncea*, berro, arugula, mostaza, Fresa, espinaca, *Chenopodium capitatum*, alfalfa, lechuga, girasol y pepino.

20 El proceso de producción de la invención también puede ser efectuado en células de las plantas mencionadas aquí. Las células por ser parte de un tejido de planta como las hojas o las células pueden estar presentes en cultivo celular como un cultivo en suspensión.

25 Los replicones de ARN adecuados pueden ser derivados de la lista de ARN virus dados más adelante. La invención puede ser aplicada a ARN virus de plantas monopartitas. Los ARN virus de plantas más preferidos de la invención pueden basarse en tobamovirus, especialmente el virus del mosaico del tabaco, y Potexvirus como el virus X de la patata. En el caso del virus del mosaico del tabaco, éste generalmente será el ORF de la proteína de movimiento que es reemplazado por un ORF de la proteína de interés a ser expresada. El ORF de la proteína de recubrimiento
30 también puede ser removido o reemplazado por un ORF de una proteína de interés.

La aplicación mayor de la presente invención es la producción de una proteína de interés en plantas, hojas de planta, tejidos de planta o cultivo celular. Si el proceso de la invención es efectuado en plantas, las plantas que no entren en la cadena alimenticia humana o animal son las preferidas, como especies de *Nicotiana*. Las plantas que
35 no entren en la cadena alimenticia de humanos o animales pueden ser cultivadas en un campo abierto y cosechadas dentro de cierto periodo después de la inducción de la liberación del replicón de ARN, donde el nivel de expresión de una o más de una proteína de interés en el tejido de planta alcance su pico. Preferiblemente, las plantas completas o partes de plantas deberán ser confinadas a un ambiente cerrado, por ejemplo, una cámara de cristal o una cámara especialmente diseñada para el periodo de incubación necesario para proporcionar el nivel deseado de expresión.

40 La eficiencia del proceso de producción de la presente invención es tal que se alcanza una nueva dimensión en los sistemas de expresión en plantas. Los niveles de expresión alcanzables con la presente invención son tales que los gastos para el procesamiento corriente abajo (incluyendo la separación y purificación de la proteína de interés) son suficientemente bajos para hacer el proceso de la invención competitivo con otros sistemas de expresión a gran escala. En los sistemas de expresión de la técnica anterior que usan plantas transformadas de manera estable con
45 vectores virales, el nivel de expresión es bajo, puesto que el descontrol de esos sistemas permite que los replicones sean producidos aún en un estado no inducido, activando de este modo mecanismos de PTGS que comprometen el rendimiento. Adicionalmente, los replicones de ARN que son capaces del movimiento célula a célula comprometen la producción de células de planta transformadas de manera estable que contienen los replicones incorporados de manera estable en el ADN cromosomal de la planta. De manera sorprendente, los inventores encontraron que es
50 mucho más fácil obtener plantas transgénicas que contengan vectores que codifican para replicones de ARN que no sean capaces del movimiento célula a célula, que plantas transgénicas que contengan replicones del ARN capaces del movimiento célula a célula. Es muy probable que este fenómeno también contribuya la nivel de expresión alta en plantas transgénicas que contienen vectores virales capaces del movimiento célula a célula. La invención proporciona el primer sistema de expresión de planta inducible de alto rendimiento que puede ser usado a gran
55 escala.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

60 Principio general de la invención. Figura 1A- propagación del replicón de ARN capaz del movimiento célula a célula; Figura 1B.- confinamiento del replicón de ARN de la invención que es deficiente para el movimiento célula a célula, a la célula donde ha ocurrido la formación no pretendida del replicón de ARN.

La Figura 2A describe regiones de ADN-T de plásmidos pICH17155, pICH17401, pICH16141, pICH17171, pICH18867, pICH17424 y pICH17388. La Figura 2B describe regiones de ADN-T de plásmidos pICH18693,

pICH18969, pICH18951, pICH19940 y pICH20592. La Figura 2C describe regiones de ADN-T de plásmidos pICH26022 y pICH26356. Las casillas blancas en las casillas grises más grandes que indican la TVCV polimerasa indican intrones que estabilizan la transcripción en el núcleo y, en consecuencia, vuelven la transferencia del replicón de ARN formado en el núcleo celular al citosol más eficiente. 3'Nos – región de terminación de transcripción del gen de nopalina sintasa; pNos – promotor del gen de nopalina sintasa; p35S-35S promotor de CaMV; pAct2 – promotor del gen de actina 2 *A. thaliana*; NLS – señal de localización nuclear; lacO – secuencia operadora del operón de lac *E. coli*; lacI – gen represor del operón lac de *E. coli*; BAR – gen que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina; int – 5' parte de la secuencia del intrón; AttP – sitio de recombinación reconocido por la integrasa phC31. NPT11 – neomicin fosfotransferasa II; sGFP – proteína fluorescente verde sintética; NTR – región no traducida tobamoviral; PalcA – promotor inducible del gen alcA de *A. nidulans* que codifica para la alcohol deshidrogenasa; alcR – activador transcripcional del regulón alc de *Aspergillus nidulans*. TVCV MP – proteína de movimiento del virus eliminador de vena; PVX CP – proteína de recubrimiento del virus X de patata; PVX Pol – ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; bloqueo genético triple de 25K, 12K, 8K; sgp – promotor subgenómico.

La Figura 3 muestra pruebas de expresión transitoria con el sistema lac inducible. Las hojas fueron infiltradas con diferentes combinaciones de plásmido recombinante y 6 días después del tratamiento fueron verificadas bajo luz UV. Los parches de luz ante un fondo negro indican fluorescencia GFP. El lado izquierdo de la hoja: ausencia del represor de lac; el lado derecho de la hoja: en presencia de un represor de lac. pICH 17424 es el provector 5' con lacO, pICH17388 es el plásmido recombinante de control correspondiente sin lacO. pICH17401 es el plásmido recombinante represor de lac. Todas las muestras contienen también un provector 3' de GFP y la integrasa.

La Figura 4A muestra hojas de plantas transformadas de manera estable con un represor de lac. Las plantas fueron agro-infiltradas con el vector pICH17171 que contiene una secuencia de lacO en su promotor y con el plásmido recombinante de control correspondiente pICH16141 que carece de una secuencia de lacO.

La Figura 4B muestra la liberación de represión por tratamiento con un ITPG. Plantas de *N. benthamiana* transformadas de manera estable con un represor de lac fueron agro-infiltradas con vector pICH17171 que contiene la secuencia de lacO en su promotor y con el plásmido recombinante de control correspondiente pICH16141. Para la inducción (imagen de la derecha), se incluyó ITPG 5mM en amortiguador de infiltración. La imagen de la izquierda es la ausencia del ITPG inductor.

La Figura 5 muestra la re-transformación de plantas que contienen represor del lacI (pICH17155 o pICH17401) con plásmidos recombinantes que proporcionan replicones de ARN. Las plantas fueron infiltradas con ITPG 5mM. La línea N6 (imagen de la izquierda) muestra la alta capacidad de inducción pero también un fondo alto, mientras que la línea N8 (imagen de la derecha) muestra bajo fondo y baja capacidad de inducción.

La figura 6 muestra una prueba de expresión transitoria con un sistema inducible por etanol basado en el vector TMV. Control: plantas tratadas 2 días después de la infiltración con agua; tratadas con etanol: plantas tratadas 2 días después de la infiltración con etanol al 4%.

La Figura 7 muestra una prueba de expresión transitoria usando el sistema inducible con etanol basado en el vector PVX. Control: plantas tratadas 2 días después de la infiltración con agua; tratadas con etanol: plantas tratadas 2 días después de la infiltración con etanol al 4%.

La Figura 8 muestra la hoja de un transformante estable que contiene ADN-T de pICH18951 bajo luz UV. La mancha verde (claro) corresponde al área infiltrada con agrobacterias que contienen pICH18693 y rociadas con alcohol.

La Figura 9 muestra una planta de *N. benthamiana* transgénica (progenie F1) que expresa GFP después del tratamiento (alcohol acuoso al 1%, y rocío – alcohol al 4%) con una solución alcohólica acuosa.

La Figura 10 muestra una planta de *N. tabacum* transgénica (progenie F1) que expresa GFP después del rocío con solución alcohólica al 4%.

La Figura 11 describe la región de ADN-T del plásmido pICH25408. Mientras que las casillas en las casillas grises más grandes que indican la TVCV polimerasa indican intrones que estabilizan el transcripto en el núcleo y en consecuencia hacen la transferencia del replicón de ARN formado en el núcleo de la célula hacia el citosol. Las casillas blancas en las casillas grises más grandes que indican la TVCV de polimerasa indican intrones que estabilizan la transcripción en el núcleo y en consecuencia, efectúan la transferencia del replicón de ARN formado en el núcleo de la célula al citosol. 3'Nos – región de terminación de la transcripción del gen de nopalina sintasa; pNos – promotor del gen de nopalina sintasa; 3'Ocs – región de terminación de la transcripción del gen de octopina sintasa; NPT11 – neomicin fosfotransferasa II; NTR – región no traducida tobamoviral; PalcA – promotor inducible del gen alcA de *A. nidulans* que codifica para la alcohol deshidrogenasa; alcR – activador transcripcional de la región alc de *Aspergillus nidulans*. TVCV MP – proteína de movimiento del virus eliminador de vena; sgp – promotor

subgenómico.

La Figura 12 muestra gel de poliacrilamida teñido con Comassie con resultados del análisis electroforético de proteína soluble total extraída de diferentes plantas transgénicas (N18, N19 y N20) que contiene la región de ADN-T del plásmido pICH25408 con gen de aprotinina.

Carril 1 – control, aislado de proteína soluble total de planta no tratada; carril 2 – plantas infiltradas con agrobacterias que contienen el plásmido que codifica para el activador alcR (pICH18693) y tratadas con etanol al 4%; carril 3 – plantas infiltradas con una mezcla de agrobacterias que contienen plásmido que codifica para el activador de alcR (pICH18693), plásmido que codifica para el vector viral que contiene gen aprotinina (pICH25408) y tratado con etanol al 4%.

La Figura 13 muestra el gel de poliacrilamida teñido con Comassie con resultados del análisis electroforético de la proteína soluble total extraída de plantas F1 obtenidas de cruces entre plantas transgénicas que contienen la región de ADN-T de plásmido pICH25408 que codifica para el vector viral con el gen de aprotinina y la planta transgénica que contiene la región de ADN-T que codifica para el activador de alcR (pICH18693). Las plantas fueron tratadas con etanol al 4%.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención describe un sistema de expresión inducible para la producción a gran escala, a alto rendimiento, de una proteína de interés usando replicones de ARN que pueden ser derivados de ARN virus monopartitas. Los replicones de ARN son capaces de expresar una o más de una proteína de interés en una planta. El proceso de la invención tiene características de bioseguridad, proporciona un fuerte control de la liberación del replicón de ARN y evita que el replicón de ARN infecte otras plantas debido a su inestabilidad para el movimiento a corta distancia (célula a célula) y, opcionalmente, también para el movimiento a larga distancia.

Hemos encontrado de manera sorprendente que la remoción de la función de movimiento célula a célula de los vectores virales de ARN facilita la selección y regeneración de plantas transformadas de manera estable que codifican para el replicón de ARN en el ADN cromosomal de una planta o células de planta. El principio básico de la invención se muestra en las Figuras 1A y 1B. En el caso de un vector viral capaz del movimiento célula a célula, la fuga de un sistema inducible hace que el vector viral se libere hacia el citosol y se propague además hacia las células vecinas (Figura 1A). Eventualmente, esto conduce a una propagación descontrolada de un vector viral dentro de una planta anfitriona que compromete el crecimiento y desarrollo de la planta. En el caso de una planta anfitriona supere ese problema y tome el control sobre la replicación del vector viral por el mecanismo de silenciamiento del gen postranscripcional (PTGS), el PTGS tendría un efecto negativo sobre el nivel de expresión de una proteína de interés en una planta anfitriona. En la presente invención, la fuga de un sistema inducible no tiene ese efecto dramático, puesto que el replicón de ARN de la invención es deficiente en el movimiento célula a célula, por lo que el PTGS es prácticamente despreciable. El replicón de ARN está esencialmente confinado a la célula y fue liberado debido a la fuga del promotor (Figura 1B), mejorando de este modo el control sobre la expresión indeseable de una proteína de interés y haciendo disminuir el efecto negativo potencial de la PTGS sobre la productividad del sistema. En la presente invención, los promotores inducibles y específicos de tejido pueden ser usados para activar la producción de una proteína de interés en plantas o células de planta. Los promotores inducibles pueden ser divididos en dos categorías de acuerdo a sus condiciones de inducción: aquellos inducibles por factores abióticos (temperatura, luz, sustancias químicas) y aquellos que pueden ser inducidos por factores bióticos, por ejemplo, ataque de patógenos o plagas. Los ejemplos de la primera categoría incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles por calor (US 05187287) e inducibles por frío (US 05847102), un sistema inducible por cobre (Mett et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 4567-4571), sistemas inducibles por esteroides (Aoyama & Chua, 1997, *Plant J.*, **11**, 605-612; McNellis et al., 1998, *Plant J.*, **14**, 247-257; US06063985), un sistema inducible por etanol (Caddick et al., 1997, *Nature Biotech.*, **16**, 177-180; WO09321334; WO0109357; WO02064802), sistema inducible por isopropil beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG) (Wilde et al., 1992, *EMBO J.*, **11**:1251-1259) y un sistema inducible por tetraciclina (Weinmann et al., 1994, *Plant J.*, **5**, 559-569).

Uno de los últimos desarrollos en el área de sistemas inducibles químicamente para plantas es un promotor quimérico que puede ser activado por glucocorticoide dexametasona y desactivado por tetraciclina (Bohner et al., 1999, *Plant J.*, **19**, 87-95). Los sistemas químicamente inducible son los más adecuados para practicar la presente invención. Para una revisión sobre los sistemas químicamente inducibles véase: Zuo & Chua, (2000, *Current Opin. Biotechnol.*, **11**, 146-151) y Moore et al., (2006, *Plant J.*, **45**: 651-683). Estará claro para el experto en la técnica que cualesquier proteína requeridas para la funcionalidad de los sistemas inducibles elegidos como represores o activadores tienen que ser expresadas en la planta o en las células de planta para volver el sistema inducible funcional (véanse los ejemplos).

En una modalidad de la invención, usamos un sistema inducible por IPTG para controlar la liberación del replicón de ARN y la producción de una proteína de interés. El diseño de los plásmidos recombinantes ejemplares se describe

en el ejemplo 1. Se clonó un gen A bacteriano que codifica para el represor lacI bajo el control del promotor constitutivo fuerte 35S. Se insertaron secuencias del operador lac duplicadas en el promotor de actina 2 de *Arabidopsis* que dirige la transcripción del replicón de ARN de la invención. Este sistema fue probado usando un ensayo de expresión transitoria como se describe en el ejemplo 2. El sistema no mostró ninguna inhibición de la liberación del replicón de ARN cuando se infiltró una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica para el replicón de ARN en una planta junto con un plásmido recombinante el represor de lacI, posiblemente debido a que la formación del replicón de ARN precedió a la síntesis del represor (Figura 3, parte inferior derecha). En realidad, cuando se usó un sistema de proveedores que requieren una recombinasa específica del sitio para el montaje del precursor de ADN del replicón de ARN (Marillonnet *et al.*, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 6852-6857) para retardar la formación del replicón, la represión de la liberación del replicón fue evidente (Figura 3, esquina superior derecha). La ausencia de un vector que proporcione el represor de lacI (Figura 3, parte superior izquierda), se observó la ausencia completa de represión de la formación de replicón de ARN en el caso del sistema de proveedor.

En otra modalidad de la invención (ejemplo 3), probaron la capacidad de plantas transgénicas transformadas de manera estable con un plásmido recombinante que proporciona el represor de lacI para reprimir la liberación del replicón de ARN de una primera secuencia nucleotídica heteróloga derivada de manera transitoria bajo el control de un promotor con la secuencia operadora de lac. Es evidente de la Figura 4A que la agroinfiltración del plásmido recombinante pICH17171 que contiene las secuencias del operador de lac no da una liberación eficiente del replicón de ARN en contraste con un experimento control con el plásmido recombinante pICH16141 que carece de esas secuencias. La coinfiltración de plantas transgénicas con los mismos plásmidos recombinantes e IPTG 1 mM condujo a la inducción de la liberación del replicón de ARN en el caso de pICH17171 (Figura 4B, panel superior derecho), mientras que en un experimento control sin IPTG, no se observó liberación del replicón de ARN (Figura 4B, panel izquierdo). La retransformación estable de las plantas que contienen el represor de lacI con un plásmido recombinante que proporciona una replicón de ARN capaz del movimiento célula a célula produjo transformantes dobles con una expresión de fondo severa en el estado no inducido (Figura 5). Resumiendo los datos obtenidos del sistema LacI/lacO, es evidente que el mejor control sobre la liberación del replicón de ARN con expresión de fondo despreciable se obtiene en el caso de un replicón de ARN deficiente del movimiento célula a célula (pICH17171, Figura 4A; Figura 4B, panel izquierdo). Los plásmidos recombinantes que contienen un MP funcional muestran una expresión de fondo severa en el estado no inducido (pICH17424, Figura 3, parte superior derecha; Figura 5, control). También, los transformantes primarios con los plásmidos recombinantes eventualmente son silenciados por la expresión del transgen, volviéndose de este modo inútiles para la expresión de alto rendimiento de una proteína de interés.

En otra modalidad de la invención, se usó un sistema inducible por etanol para controlar la liberación del replicón de ARN en plantas transgénicas. El diseño de plásmido recombinante se describe en el ejemplo 5 y una presentación esquemática de los plásmidos recombinantes se muestra en la Figura 2B. Los resultados de los experimentos de expresión transitoria de los plásmidos recombinantes se muestran en la Figura 6. Es evidente que el sistema inducible por etanol proporciona un control estrecho sobre la liberación del replicón de ARN, puesto que la expresión de GFP puede ser observada únicamente en experimentos donde los plásmidos recombinantes con el activador del alcR fueron coinfiltrados. Prácticamente no se observó expresión de fondo en ausencia del plásmido recombinante de alcR y/o el inductor químico etanol (se observó una expresión despreciable en presencia del plásmido recombinante de alcR). La agroinfiltración de plantas transgénicas *N. benthamiana* para plásmidos recombinantes que proporcionan un replicón de ARN (pICH18951) con plásmidos recombinantes de alcR en presencia de etanol al 4% mostraron formación de replicón de ARN reportada por una fuerte expresión de GFP (Figura 8). De manera sorprendente, en el sistema inducible por etanol no se obtuvieron transformantes primarios (no aún con la falta de control sobre la liberación del replicón de ARN) con plásmidos recombinantes virales que contienen un MP funcional (Ejemplo 5). Esto puede ser explicado por la fuga o descontrol del sistema en cultivo de callo/células de planta (Roberts *et al.*, 2005, *Plant Physiol.*, 138:1259-1267) debido al movimiento célula a célula del replicón de ARN. Esta explicación es apoyada por el descubrimiento sorprendente que los transformantes primarios que proporcionan los replicones de ARN bajo el control del promotor inducible con etanol podrían ser generados sin dificultades, si el replicón de ARN no codifica para una proteína para el movimiento célula a célula en la planta anfitriona usada. También demostramos que la progenie de la cruce de plantas transgénicas con un vector que proporciona un replicón de ARN y transgénicas que contienen alcR revelan una fuerte expresión ubicua de GFP después del tratamiento con etanol (Figuras 9 y 10). En otra modalidad de esta invención, demostramos que nuestro sistema trabaja eficientemente con proteínas diferentes a las del gen reportero, como GFP. Un plásmido recombinante para la expresión de aprotínina se muestra en la Figura 11. El análisis de producción de aprotínina recombinante en la progenie de F1 de plantas *N. benthamiana* después del tratamiento con alcohol demostró un alto nivel de expresión detectable en gel teñido con Coomassie como una de las bandas de proteína principales.

En los ejemplos, usamos replicones de ARN basados en TMV. Sin embargo, pueden ser usados muchos virus diferentes pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos para la construcción de vectores basados en ARN virus de acuerdo a la presente invención. Los nombres de los órdenes, familias y géneros están en cursivas, y son los aprobados por el ICTV. Los nombres taxonómicos en las citas (y no en cursivas) indican que este taxón no tiene un nombre internacional aprobado por la ICTV. Los nombres de las especies (vernáculos) se dan en escritura regular. Los virus sin asignación formal de género o familia son indicados):

ARN Virus:

ARNss Virus: Familia: *Bromoviridae*, Género: *Alfavirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico de la alfalfa, **Género:** *Ilarvirus*, **Especies tipo:** virus del moteado del tabaco, **Género:** *Bromovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico de bromelia, **Género:** *Cucumovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico del pepino;

Familia: *Closteroviridae*, **Género:** *Closterovirus*, **Especies tipo:** virus del amarillamiento de la remolacha, **Género:** *Crinivirus*, **Especies tipo:** virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga, **Familia:** *Comoviridae* **Género:** *Comovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico de buí, **Género:** *Fabavirus*, **Especies tipo:** virus del marchitamiento de la haba 1 **Género:** *Nepovirus*, **Especies tipo:** virus de las manchas anulares del tabaco;

Familia: *Potyviridae*, **Género:** *Potyvirus*, **Especies tipo:** virus Y de la patata, **Género:** *Rymovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico del ballico, **Género:** *Bymovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico amarillo de la cebada;

Familia: *Sequiviridae*, **Género:** *Sequivirus*, **Especies tipo:** virus del moteado amarillo de la pastinaca, **Género:** *Waikavirus*, **Especies tipo:** virus esférico del arroz tungro, **Familia:** *Tombusviridae*, **Género:** *Carmovirus*, **Especies tipo:** virus del moteado del clavel, **Género:** *Dianthovirus*, **Especies tipo:** virus de las manchas amarillas del clavel,

Género: *Machlomovirus*, **Especies tipo:** virus del moteado clorótico del maíz, **Género:** *Necrovirus*, **Especies tipo:** virus de la necrosis del tabaco, **Género:** *Tombusvirus*, **Especies tipo:** virus de la atrofia breñosa del tomate, **Género no Asignado del ssARN virus**, **Género:** *Capillovirus*, **Especies tipo:** virus del crecimiento del tallo del manzano;

Género: *Carlavirus*, **Especies tipo:** virus latente del clavel; **Género:** *Enamovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico de enación del guisante,

Género: *Furovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico del trigo que se encuentra en el suelo, **Género:** *Hordeivirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico veteado de la cebada, **Género:** *Idaeovirus*, **Especies tipo:** virus del empedecimiento breñoso de la frambuesa;

Género: *Luteovirus*, **Especies tipo:** virus del empedecimiento por amarillamiento de la cebada; **Género:** *Marafivirus*, **Especies tipo:** virus del rayado fino del maíz; **Género:** *Potexvirus*, **Especies tipo:** virus X de la patata;

Género: *Sobemovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico del frijol Sur, **Género:** *Tenuivirus*, **Especies tipo:** virus del veteado del arroz,

Género: *Tobamovirus*, **Especies tipo:** virus del mosaico del tabaco,

Género: *Tobravirus*, **Especies tipo:** virus del castaño del tabaco,

Género: *Trichovirus*, **Especies tipo:** virus de las manchas cloróticas de las hojas del manzano; **Género:** *Tymovirus*,

Especies tipo: virus del mosaico amarillento del nabo; **Género:** *Umbravirus*, **Especies tipo:** virus del moteado de la

zanahoria; **ssARN Virus Negativos:** Orden: *Mononegavirales*, Familia: *Rhabdoviridae*, **Género:** *Cytorhabdovirus*,

Especies tipo: virus del amarillamiento necrótico de la lechuga, **Género:** *Nucleorhabdovirus*, **Especies tipo:** virus del empedecimiento por el amarillamiento de la patata;

ssARN Virus Negativos: Familia: *Bunyaviridae*, **Género:** *Tospovirus*, **Especies tipo:** virus del marchitamiento moteado del tomate;

dsARN Virus: Familia: *Partitiviridae*, **Género:** *Alphacryptovirus*, **Especies tipo:** virus críptico del clavo blanco 1,

Género: *Betacryptovirus*, **Especies tipo:** virus críptico del clavo blanco 2, **Familia:** *Reoviridae*, **Género:** *Fijivirus*,

Especies tipo: virus de la enfermedad de Fiji, **Género:** *Phytoreovirus*, **Especies tipo:** virus del tumor de heridas,

Género: *Oryzavirus*, **Especies tipo:** virus que impide el crecimiento desigual del arroz;

Virus No Asignados: ssADN de Genoma: **Especies:** virus de la parte superior del ramillete del plátano, **Especies:**

virus del marchitamiento foliar del coco, **Especies:** virus que impide el crecimiento del clavo subterráneo,

Genoma: dsADN, **Especies:** virus del amarillamiento de la vaina del pepino; **Genoma:** dsARN, **Especies:** virus que impide el crecimiento del tabaco,

Genoma: ssARN, **Especies:** virus de Ajo A, B, C, D, **Especies:** virus del moteado de la vid, **Especies:** virus de

mosaico de rayado blanco del maíz, **Especies:** virus latente de olivo 2, **Especies:** virus de ourmia melon, **Especies:**

virus del manchado zonal de Pelargonio;

Satélites y Viroides: Satélites: Virus Satélites de ssARN: Virus Satélite del Subgrupo 2, **Especies tipo:** satélite de la necrosis del tabaco,

ARN Satélite, Subgrupo 2 Satélites de ARNm Tipo B, Subgrupo 3C Satélites de ARN de tipo lineal, Subgrupo 4

Satélites de ARN circulares de tipo D,

Viroides, Especies tipo: viroide del tubérculo espigar de la patata.

Diferentes ARN virus tienen una o más proteínas virales para el movimiento célula a célula o a corta distancia. Por ejemplo, en el caso de TMV, se requiere una proteína (MP); el Virus del Mosaico de Bromelia (BMV) tripartita requiere dos proteínas - 3a y CP. El virus X de la patata (PVX) ARN virus monopartita tiene 4 proteínas responsables del movimiento célula a célula: proteínas codificadas por el bloque genético triple (TGB) y la proteína de recubrimiento (CP). Sin embargo, una deficiencia en una de dos o más proteínas requeridas para el movimiento célula a célula es suficiente para bloquear el movimiento a corta distancia eficiente de un vector viral. Para más detalles acerca de las proteínas de movimiento viral de plantas, véase la reciente revisión de WJ Lucas (2006, *Virology*, 344:169-184).

En la presente invención, en la primera secuencia nucleotídica heteróloga tiene un segmento de secuencia que codifica para el replicón de ARN. De manera alternativa, la primera secuencia nucleotídica heteróloga puede tener más de un segmento de secuencia que codifiquen juntos para el replicón de ARN, es decir que el replicón de ARN no es codificado por un ADN continuo. En su lugar, el replicón de ARN codificado de manera discontinua por dos o

más segmentos de secuencia, por lo que los segmentos pueden estar presentes contiguos entre sí. La formación del replicón de ARN puede entonces requerir el rearrreglo de los segmentos por ejemplo por recombinación. Una recombinasa para la recombinación puede ser proporcionada por una planta anfitriona modificada, confinando de este modo la expresión inducible del replicón viral a una planta anfitriona capaz de expresar la recombinasa. Como un ejemplo, un segmento de secuencia puede codificar para una parte de la polimerasa del replicón de ARN, y otros segmentos de secuencia que codifiquen para otra parte de la polimerasa puede estar presente en la primera secuencia nucleotídica heteróloga en una orientación volteada con relación al primer segmento de la secuencia. La parte volteada puede estar flanqueada por sitios de recombinación (véase la WO2004/108934). En esta situación, el transcripto de la primera secuencia nucleotídica heteróloga o un segmento de secuencia de la misma no será un replicón de ARN, puesto que ninguna polimerasa funcional puede ser trasladada desde el transcripto. Proporcionar una recombinasa específica del sitio que reconozca los sitios recombinantes permite doblar uno de los segmentos de modo que un replicón sea codificado continuamente. En esta modalidad, proporcionar la recombinasa puede funcionar como un conmutador para cambiar la formación y expresión del replicón de ARN de una secuencia de interés en el estado inducido y contribuye a una alta seguridad biológica. Preferiblemente, la recombinasa está bajo el control de un promotor inducible. Si es usada una recombinasa para cambiar el proceso de la invención, la recombinasa puede ser proporcionada a la planta u hojas de planta de manera transitoria, por lo que la provisión puede actuar como un conmutador para expresar una o más de una proteína de interés. Preferiblemente, esa recombinasa puede ser codificada de manera estable en células de planta, y expresar la recombinasa bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. La inducción de la expresión de recombinasa induciendo el promotor puede entonces causar la expresión de la secuencia de interés. En una modalidad, la recombinasa será codificada por la primera secuencia nucleotídica heteróloga y la expresión de la recombinasa será bajo el control del promotor inducible de la primera secuencia nucleotídica heteróloga.

De manera alternativa, ambos segmentos pueden estar presentes en diferentes ADN-T incorporados de manera estable en diferentes cromosomas de planta. La formación de un replicón de ARN requerirá entonces la transcripción de ambos segmentos y el transempalme de ambos transcriptos para montar el replicón de ARN. Esta modalidad puede ser usada para segregar rápidamente los segmentos que codifican juntos para el replicón de ARN en plantas o células de la progenie como se describe en la WO02/097080, contribuyendo de este modo a la seguridad biológica del sistema.

En los ejemplos, describimos plantas transgénicas que codifican para un tipo de replicón de ARN derivado de un virus de planta. Sin embargo, en el proceso de la invención, pueden ser usados dos o más replicones de ARN diferentes (de manera notable dos o más replicones de ARN monopartitas) en una planta transgénica o células de planta, por lo que esos diferentes replicones de ARN son derivados preferiblemente de diferentes virus de plantas. Esos diferentes virus de planta de los cuales pueden ser derivados diferentes replicones de ARN son preferiblemente virus sinérgicos o no competitivos. "Sinérgicos" y "no competitivos" se usan aquí de manera sinónima. Los virus sinérgicos pueden coexistir y amplificarse eficientemente en las mismas células de planta. De manera similar, los replicones de ARN derivados de ARN virus sinérgicos pueden coexistir y amplificarse de manera eficiente en las mismas células de planta. Un ejemplo de ese par sinérgico de replicones de ARN es un par de replicones de ARN por lo que un replicón de ARN es derivado de TMV y el otro replicón de ARN es derivado de PVX. Esos replicones de ARN sinérgicos pueden ser liberados de diferentes casetes de expresión utilizando el mismo o diferentes promotores inducibles. Los replicones de ARN sinérgicos pueden ser usados para la expresión de dos o más proteínas o subunidades proteicas de interés, como la cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal en la misma célula de planta. Los procesos de expresión de dos o más proteínas de interés en la misma planta o en las mismas células de plantas usando vectores virales (no competitivos) se describen en la WO 2006/79546 (PCT/EP2006/000721) la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

En los ejemplos, usamos predominantemente ADN-T mediado por *Agrobacterium* liberado en células de planta, por lo que el ADN-T contiene la primera y/o segunda secuencia nucleotídica heteróloga. Pueden ser usados varios métodos para la liberación de vectores en células de planta como la introducción directa de una secuencia nucleotídica heteróloga en células por medio de bombardeo de microproyectiles, la electroporación o transformación mediada por PEG de protoplastos. Se prefiere una transformación de la planta mediada por *Agrobacterium*. De este modo, una secuencia nucleotídica heteróloga puede ser transformada en células de planta por varias tecnologías como por el vector plasmídico Ti portado por *Agrobacterium* (US 5,591,616; US 4,940,838; US 5,464,763) bombardeo de partículas o microproyectiles (US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). En principio, también pueden ser usados otros métodos de transformación de plantas, por ejemplo la microinyección (WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), electroporación (EP00564595B1); EP00290395B1; WO 08706614A1), etc. La elección del método de transformación depende *inter alia* de las especies de planta a ser transformadas. Por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles puede ser preferido para la transformación de monocotiledóneas mientras que para las dicotiledóneas, la transformación mediada por *Agrobacterium* da generalmente mejores resultados.

La presente invención se lleva a cabo preferiblemente con plantas multicelulares superiores. Las plantas preferidas para usarse en esta invención incluyen cualquier especie de planta dándose preferencia a las especies agrícola y

hortícolamente importantes. Las plantas de cultivo comunes para usarse en la presente invención incluyen alfalfa, cebada, frijoles, canola, capuí, algodón, maíz, trébol, loto, lentisco, altramuz, mijo, avenas, guisantes, cacahuates, arroz, centeno, clavo de olor, girasol, guisante de olor, soya, sorgo tritical, camote, frijol aterciopelado, arveja, trigo, wisteria y plantas de nuez. Las especies de plantas preferidas para practicar esta invención incluyen pero no se restringen a:

Representante de Graminae, Compositae, Solanaceae y Rosaceae. Adicionalmente, especies preferidas para usarse en la invención, así como aquellas especificadas anteriormente, plantas de los géneros: Arabidopsis, Agrostis, Allium, Antirrhinum, Apium, Arachis, Asparagus, Atropa, Avena, Bambusa, Brassica, Bromus, Browaalia, Camellia, Cannabis, Capsicum, Cicer, Chenopodium, Chichorium, Citrus, Coffea, Coix, Cucumis, Curcubita, Cynodon, Dactylis, Datura, Daucus, Digitalis, Dioscorea, Elaeis, Eleusine, Festuca, Fragaria, Geranium, Glycine, Helianthus, Heterocallis, Hevea, Hordeum, Hyoscyamus, Ipomoea, Lactuca, Lens, Lilium, Linum, Lolium, Lotus, Lycopersicon, Majorana, Malus, Mangifera, Manihot, Medicago, Nemesis, Nicotiana, Onobrychis, Oryza, Panicum, Pelargonium, Pennisetum, Petunia, Pisum, Phaseolus, Phleum, Poa, Prunus, Ranunculus, Raphanus, Ribes, Ricinus, Rubus, Saccharum, Salpiglossis, Secale, Senecio, Setaria, Sinapis, Solanum, Sorghum, Stenotaphrum, Theobroma, Trifolium, Trigonella, Triticum, Vicia, Vigna, Vitis, Zea y la Olyreae, la Pharoideae y muchas otras.

En una modalidad de la invención, los replicones de ARN derivados de TMV son usados con plantas de *Nicotiana*. En otra modalidad, los replicones de ARN derivados de PVX son usados con plantas de *Nicotiana*.

Las proteínas de interés, o fragmentos de las mismas, que pueden ser expresadas, en orientación sentido o antisentido, usando la invención incluye: enzimas modificadoras de almidón (almidón sintasa, enzima de fosforilación de almidón, enzima desramificante, enzima ramificante de almidón, enzima ramificante de almidón II, gránulo unido a almidón sintasa), fosfato de sucrosa sintasa, sucrosa fosforilasa, poligalacturonasa, polifruktan sucrasa, ADP glucosa pirofosforilasa, ciclodextrin glicosiltransferasa, fructosil transferasa, glicógeno sintasa, pectin esterasa, aprotinina, avidina, levansucrasa bacteriana, proteína glgA de *E. coli*, MAPK4 y ortólogos, enzimas de asimilación/metabolismo del nitrógeno, glutamina sintasa, osmotina de planta, albúmina 2S, taumatina, recombinasa/integrasa específica del sitio (FLP, Cre, R recombinasa, Int, SSVI Integrasa R, Integrasa phiC31, un fragmento activo o variante de la misma), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de soya), toxina del tipo de coleopteros o un fragmento insecticidamente activo, proteína de fusión de enzima conjugante de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, superóxido dismutasa, proenzima inactiva de una proteasa, toxinas de proteína de planta, fibras que alteran rasgos en plantas que producen fibras, toxina activa de Coleoptero de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt2, proteína cristalina insecticida (ICP), toxina CryIC, delta endotoxina, toxina poliopeptídica, protoxina etc.), toxina específica de insectos AaIT, enzimas degradantes de celulosa, células E1 de *Acidothermus celluloticus*, enzimas modificadoras de lignina, cinamol alcohol deshidrogenasa, trehalosa-6-fosfato sintasa, enzimas de la vía metabólica de la citoquinina, HMG-CoA reductasa, pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*, proteína de almacenamiento de semillas, licopen sintasa de *Erwinia herbicola*, ACC oxidasa, proteína codificada por pTOM35, fitasa, cetohidrolasa, acetoacetil CoA reductasa, PHB (polihidroxibutanoato) sintasa, proteína portadora de acilo, napina, EA9, fitoeno sintasa de plantas no superiores, proteína codificada por pTOM5, ETR (receptor de etileno), piruvato fosfato dicinasa plastídica, proteína del poro transmembranal inducible por nematodos, función fotosintética o plastídica mejoradora de rasgos de células de planta, estilbeno sintasa, una enzima capaz de hidroxilar fenoles, catecol dioxigenasa, catecol 2,3- dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, antranilato sintasa, proteína AGL15 de *Brassica*, fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), AMV ARN3, PVY replicasa, PLRV replicasa, proteína de recubrimiento de potivirus, proteína de recubrimiento de CMV, proteína de recubrimiento de TMV, duplicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa geminiviral mutante, C12:0 de *Umbellularia californica* prefiriendo la acil-ACP tioesterasa, C10 o C12:0 de planta prefiriendo la acil-ACP tioesterasa, C14:0 prefiriendo la acil-ACP tioesterasa (luxD), factor A de sintasa de planta, factor B de sintasa de planta, 6-desaturasa, proteína que tiene una actividad enzimática en la oxidación peroxisomal de ácidos grasos en células de planta, acil-CoA oxidasa, 3-cetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA-carboxilasa de maíz, 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP), fosfinotricin acetil transferasa (BAR, PAT), proteína CP4, ACC desaminasa, ribozima, proteína que tiene sitio de escisión postraslacional, proteína de fusión consistente de de un dominio de unión de ADN de activador transcripcional Gal4 y un dominio de activación transcripcional, una fusión traslacional de proteína oleosina con proteína de interés capaz de dirigir la fusión de proteína en la fase lipídica, gen de DHPS que confiere resistencia a la sulfonamida, nitrilasa bacteriana, 2,4-D monooxigenasa, acetolactato sintasa o acetohidroxiácido sintasa (ALS, AHAS), poligalacturonasa, nitrilasa bacteriana, fusión de la región hidrofóbica amino terminal de una proteína translocadora de fosfato madura que reside en la membrana de la envoltura interna del plástido con proteína de interés a ser dirigida hacia la membrana, etc.

Cualquier proteína humana o animal puede ser expresada usando un sistema de la invención. Los ejemplos de esas proteínas de interés incluyen *inter alia* las siguientes proteínas (proteínas farmacéuticas): proteínas de respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, receptores de células T, etc.), antígenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas hormonas polipeptídicas, citocinas y sus receptores, interferones, factores del crecimiento y factores de la coagulación, enzima lisosomal enzimáticamente activa, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación de la sangre, tripsinógeno, 1-antitripsina (AAT), así como proteínas que

conservan su función como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas anteriores.

La descripción de la solicitud de patente Europea No. 06 011 002 presentada en Mayo 29, 2006 y de la solicitud de patente provisional US 60/810,398 presentada en Junio 2, 2006, las prioridades de las cuales son reclamadas por la presente solicitud de patente se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Sistema lac inducible por IPTG: diseño de plásmidos recombinantes

El represor de lac (*lacI*, Acc. J01636) fue amplificado por PCR usando cebadores *lacIpr1* (SEQ ID NO: 1) (5'-gat cca tgg aac cag taa cgt tat ac-3') y *lacIpr2* (SEQ ID NO: 2) (5'-tc tgg atc ctc act gcc cgc ttt cca gtc g-3') y se clonaron como fragmento de NcoI-BamHI en el vector binario estándar pICBV1 dando el plásmido recombinante pICH17155 (Figura 2A). Se introdujo una señal de localización nuclear (NLS) al N-terminal usando cebador *lacIpr5* (SEQ ID NO:3) (5'-cga cat ggg ccc taa gaa gaa gag gaa ggt tga acc agt aac gtt ata cga tgt c-3') en lugar de *lacIpr1* dando el plásmido recombinante pICH17401 (Figura 2A). Este plásmido recombinante fue transformado en plantas de *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* usando técnicas de transformación estándar (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231).

Se introduce una secuencia operadora de lac sintética (SEQ ID NO:4) (aat tgt gag cgc tca caa tt) entre la casilla de TATA y el inicio transcripcional del promotor de actina 2 (An *et al.*, 1996, *Plant J.*, 10: 107-121) de varios vectores virales. Esto se hizo combinando dos productos de PCR superpuestos producidos con los cebadores A: *brb4nosph* (SEQ ID NO:5) (5'-gga acc ctg tgg ttg gca cat-3') y *lacOact2pr2* (SEQ ID NO: 6) (5'- cga att gtg agc gct cac aat tta tat agg cgg gtt tat ctc -3') y cebadores B: *lacOactpr1* (SEQ ID NO: 7) (5'- taa att gtg agc gct cac aat tgc ctt tga agt ttt agt ttt att g -3') y *rdrpr4* (SEQ ID NO: 8) (5'- ttt ctgcag gaa atg aaa gcc cgc gaa aca ag -3'). El producto resultante fue clonado como fragmento de KpnI-SphI en el vector viral pICH16141 dando como resultado el vector pICH17171. Se derivaron vectores virales adicionales de pICH17171 subclonando el promotor usando enzimas de restricción convenientes. Esos vectores fueron optimizados por expresión (Marillonnet *et al.*, 2005, *Nat Biotechnol.*, 23: 718-723) y contenían MP completo (pICH18867) o una supresión de MP (pICH17171). Adicionalmente, se construyó un provector 5' (Marillonnet *et al.*, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:6852-6857) (pICH17424) que probó ser útil para pruebas transitorias (véase el Ejemplo 2).

Ejemplo 2

Prueba de represión de eficiencia en un sistema transitorio

Se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria usando una mezcla de cepas agrobacterianas que albergan diferentes plásmidos recombinantes bajo prueba. No se pudo observar ninguna represión en los ensayos transitorios usando a la vez vectores virales completamente montados. Muy probablemente, el plásmido recombinante ya estaba transcrito en el replicón de ARN viral antes de la traducción del represor. De este modo, usamos provectores virales pICH17424 (Figura 2A) y pICH6892 (Marillonnet *et al.*, 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:6852-6857) que se montaron *in planta* en el precursor de ADN del replicón de ARN por la actividad de una recombinasa específica del sitio (Marillonnet *et al.*, 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:6852-6857). Este paso adicional deberá retrasar el montaje del vector viral y proporcionar suficiente tiempo para que el represor sea traducido y unido a la secuencia operadora en el plásmido recombinante viral. En realidad, podríamos observar una fuerte represión de la amplificación viral usando este método (Figura 3).

Ejemplo 3

Actividad represora de lacI en plantas transformadas de manera estable e inducción por IPTG

El plásmido recombinante represor pICH17401 (Figura 2A) fue transformado de manera estable en plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana* usando técnicas de transformación estándar (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231). La actividad represora fue demostrada por agroinfiltración de plantas transformadas con plásmidos recombinantes virales que contienen lacO (figura 4A). La inducibilidad fue probada de manera similar por agroinfiltración con los mismos plásmidos recombinantes e incluyendo IPTG en el amortiguador de infiltración (Figura 4B).

Ejemplo 4

Retransformación de las plantas que contienen represor con plásmidos recombinantes virales.

Las plantas de *N. tabacum* que contienen el ADN recombinante represor de lac (pICH17401, Figura 2A) integrado de manera estable en su genoma fueron transformadas una segunda vez con un plásmido recombinante de vector viral

completo que contiene el operador de lac (pICH18867, Figura 2A). Pudieron ser generadas varias plantas, pero todas ellas mostraron una expresión de fondo más o menos severa del vector viral.

La infiltración de IPTG (5 mM) en las hojas dobles transformantes podrían realmente inducir la amplificación del replicón de ARN en algunas de las plantas transgénicas (Figura 5). Sin embargo, encontramos que todos los transformantes primarios con expresión descontrolada del replicón de ARN fueron eventualmente objeto del silenciamiento del transgen y progenie producida que no mostró ninguna liberación del replicón de ARN bajo condiciones inductoras.

Ejemplo 5

Diseño de plásmidos recombinantes para sistemas inducibles con etanol

El principio del sistema inducible con etanol fue descrito por Caddick y sus colegas (1998, *Nat Biotechnol.*, 16:177-180). El activador transcripcional alcR bajo el control del promotor de CaMV 35S (plásmido recombinante pICH18693, Figura 2B) fue diseñado de acuerdo a lo descrito por Caddick y sus colegas (1998, *Nat Biotechnol.*, 16:177-180). Este plásmido recombinante fue transformado de manera estable en plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana* (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231). El promotor alcA fue amplificado por PCR usando los cebadores alcApr1 (SEQ ID NO:9) (5'-cat gaa ttc tag gat tgg atg cat gcg g-3') y alcApr2 (SEQ ID NO: 10) (5'-cag ctc gag gtc gtc ctc tcc aaa tga aat g-3') y se fusionó como fragmento de EcoRI-Xho1 a vectores virales basados en TMV con (pICH18969, Figura 2B) o sin (pICH18951, Figura 2B) MP funcional y por separado al MP viral funcional (pICH19940, Figura 2B). Adicionalmente, los plásmidos recombinantes pICH18951 y pICH19940 fueron combinados en un vector (pICH20592, Figura 2B). Todos esos plásmidos recombinantes, excepto pICH18969, fueron transformados tanto en *N. tabacum* como en *N. benthamiana* usando técnicas de transformación estándar. No fue posible obtener transformantes primarios con plásmidos recombinantes que codifican para un replicón de ARN con un MP funcional.

El promotor alcA también fue amplificado usando los cebadores alcApr4 (SEQ ID NO: 11) (5'- cgc gca tgc tac tag gat tgg ata cat gcg gaa c-3') y alcApr5 (SEQ ID NO: 12) (5'- ttt ggt ctc atc aac tcc aaa tga aat gaa ctt cc -3') y clonados como fragmento de SphI-BsaI en el vector viral basado en PVX pICH25233 que reemplaza al promotor 35S y que da el plásmido recombinante pICH26022 (Figura 2C). La fusión del promotor alcA a la proteína de recubrimiento PVX implicada en el movimiento célula a célula (pICH26356, Figura 2C) se efectuó clonando un fragmento de EcoRI-SacI de pICH19940 en pICH22066.

Ejemplo 6

Expresión transitoria de plásmidos recombinantes de TMV inducidos por etanol.

Los plásmidos recombinantes mencionados anteriormente fueron probados por agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* (Figura 6). Las plantas fueron tratadas a los dos días después de la infiltración con solución de etanol al 4% o con agua como control. La amplificación del vector viral y la expresión de GFP fueron inducidas únicamente en las plantas tratadas con etanol y únicamente en presencia del activador alcR. Se observó una expresión de fondo muy débil en plantas control en presencia de alcR.

Ejemplo 7

Expresión transitoria de plásmidos recombinantes de PVX inducidos por etanol

El plásmido recombinante alcA-CP (pICH26356) fue coinfiltrado con alcR (pICH18693) y un vector viral deficiente CP (pICH21692). El movimiento célula a célula puede ser detectado únicamente en plantas tratadas con etanol y no puede observarse diferencia con un plásmido recombinante de CP promotor 35S (Figura 7).

Ejemplo 8

Análisis de plantas transformadas de manera estable con plásmidos recombinantes virales pICH18951 y pICH20592

Plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* fueron transformadas de acuerdo a protocolos estándar (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231). Las plantas regeneradas fueron analizadas por la presencia del transgen por agroinfiltración con el plásmido recombinante alcR (pICH18693) y tratamiento con etanol. En realidad, la mayoría de las plantas mostraron expresión de GFP en la parte infiltrada de las hojas y sin fondo en otras partes (Figura 8).

Ejemplo 9

Inducción de plantas transgénicas completas

Las plantas transgénicas que contienen pICH18951 o pICH20592 (descritas en el Ejemplo 8) fueron cruzadas con aquéllos que contienen el activador transcripcional alcR (pICH18693). La progenie F1 de aquellas plantas fue tratada con etanol por rocío con etanol al 4% o por una combinación de empataado de la raíz (con etanol al 1%) y rocío (etanol al 4%). La amplificación viral y de este modo la expresión de GFP es detectada en casi todas las partes de esas plantas (Figura 9). De manera más notable, también se detectó expresión en el tallo y pecíolos de aquellas plantas tratadas con empataado de la raíz. Esas partes de las plantas usuales no muestran o solo muestran una débil expresión usando el procedimiento de Magnificación estándar, es decir infiltración al vacío de plantas completas (Marillonnet *et al.*, 2005, Nat. Biotechnol., 23: 718-723). El rocío de las plantas con etanol al 4% sin empataado de la raíz conduce a la expresión de GFP únicamente en tejido blando de las hojas, pero no en el tallo y los pecíolos de las hojas (Figura 10).

Ejemplo 10

Uso del sistema de vector viral inducible para la expresión de aprotinina recombinante en plantas

El plásmido pICH25408 (Figura 11) fue diseñado de manera similar al plásmido pICH20592 (véase el EJEMPLO 5). Las plantas de *N. benthamiana* fueron transformados con pICH25408 de acuerdo a protocolos estándar (Horsh *et al.*, 1985, *Science*, 227, 1229-1231). Las plantas regeneradas fueron analizadas por la presencia del transgen por agroinfiltración con el plásmido recombinante alcR (pICH18693) y tratamiento con etanol seguido por el análisis de la expresión de la proteína recombinante por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAAG). Parte del tejido de la hoja agroinfiltrado con plásmido recombinante con alcR (pICH18693) y tratado con etanol fue usado para la extracción de proteína soluble total por amortiguador 2x de Laemmli (tris-HCl 125 mM, pH 7.8, β -mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0.001%, SDS al 10%) seguido por separación electroforética en PAAG. Los resultados de esos análisis para diferentes transformantes primarios se muestran en la Figura 12.

En el siguiente paso, las plantas transformadas con pICH25408 fueron cruzadas con plantas que contienen el gen alcR (pICH18693). La proteína soluble aislada total del tejido de hoja de la progenie de F1 después del tratamiento con etanol fue analizada sobre PAAG. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 13. Es evidente que la aprotinina es expresada en un alto nivel (aproximadamente 1 mg/g de biomasa de hoja fresca).

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir una o más de una proteína de interés, que comprende:
 - (a) proporcionar una planta o célula de planta que comprende:
 - (i) en un cromosoma nuclear una primera secuencia nucleotídica heteróloga que comprende:
 - una secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN, y un primer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN;
 - el replicón de ARN no codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta;
 - (ii) una segunda secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN, donde la segunda secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segundo promotor inducible ligado operativamente a la secuencia que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN; y
 - (b) inducir, en la planta o célula de la planta del paso (a), el primer y segundo promotor inducible, produciendo por lo tanto una o más de una proteína de interés en la planta o en la célula de planta, respectivamente.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde el primero y segundo promotor inducibles son inducibles por la misma señal inductora.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el primero o el segundo promotor inducible es un promotor inducible químicamente.
4. Proceso según la reivindicación 3, donde el promotor inducible químicamente es seleccionado del grupo que consiste de un promotor inducible por etanol, un promotor inducible por IPTG, y un promotor inducible por tetraciclina.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el promotor inducible es un promotor inducible por choque térmico.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el replicón de ARN es derivado de un ARN virus de una sola hebra de sentido positivo.
7. Proceso según la reivindicación 6, donde el ARN virus de una sola hebra de sentido positivo es el virus del mosaico del tabaco o el virus X de la patata.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la planta comprende una tercera secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN adicional y un tercer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia que codifica para el replicón de ARN adicional, no codificando el replicón de ARN adicional para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN ni del replicón de ARN adicional en la planta, codificando el replicón de ARN adicional para una proteína de interés.
9. Proceso según la reivindicación 8, donde la planta comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN adicional ligado operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN.
10. Proceso según la reivindicación 9, donde la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN y la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN adicional son las mismas proteínas o son proteínas diferentes.
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el tercer promotor inducible es inducible por el mismo agente inductor que el primer promotor inducible.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el replicón de ARN y el replicón de ARN adicional no son replicones competitivos.
13. Proceso según la reivindicación 12, donde los replicones no competitivos son replicones virales de planta derivados de virus de planta de diferentes géneros de virus.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el paso (a) comprende hacer crecer una planta de una semilla que comprende la primera secuencia nucleotídica heteróloga y opcionalmente la

segunda y/o la tercera secuencia nucleotídica heteróloga.

15. Planta o célula de planta que comprende:

- 5 (i) en un cromosoma nuclear una primera secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un replicón de ARN, y un primer promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para el replicón de ARN;
el replicón de ARN no codifica para una proteína que proporciona el movimiento célula a célula del replicón de ARN en la planta;
el replicón de ARN codifica para una polimerasa para replicar el replicón de ARN; y
- 10 (ii) una segunda secuencia nucleotídica heteróloga que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN, en donde la segunda secuencia nucleotídica heteróloga comprende un segundo promotor inducible ligado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína que permite el movimiento célula a célula del replicón de ARN.

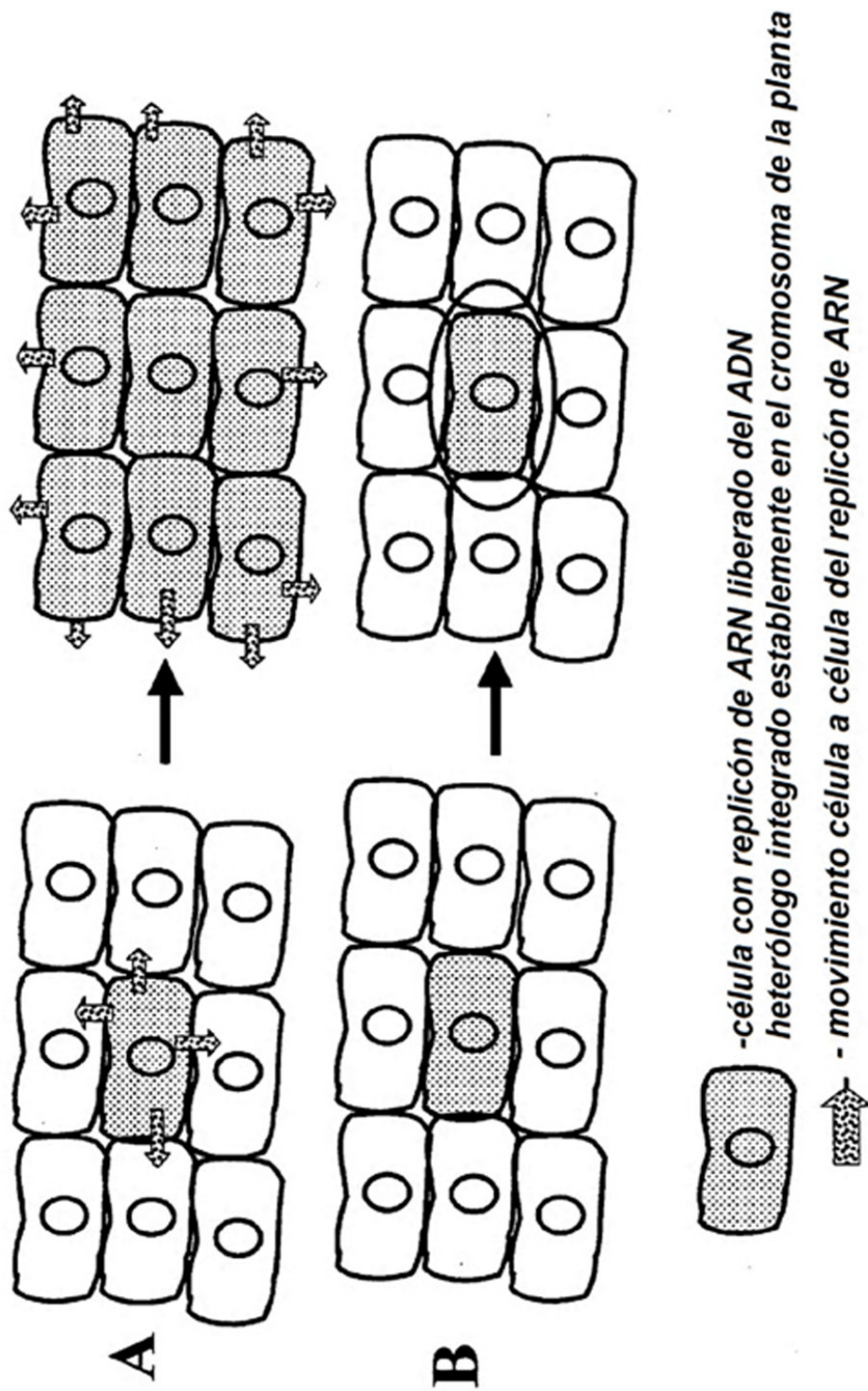


Fig. 1

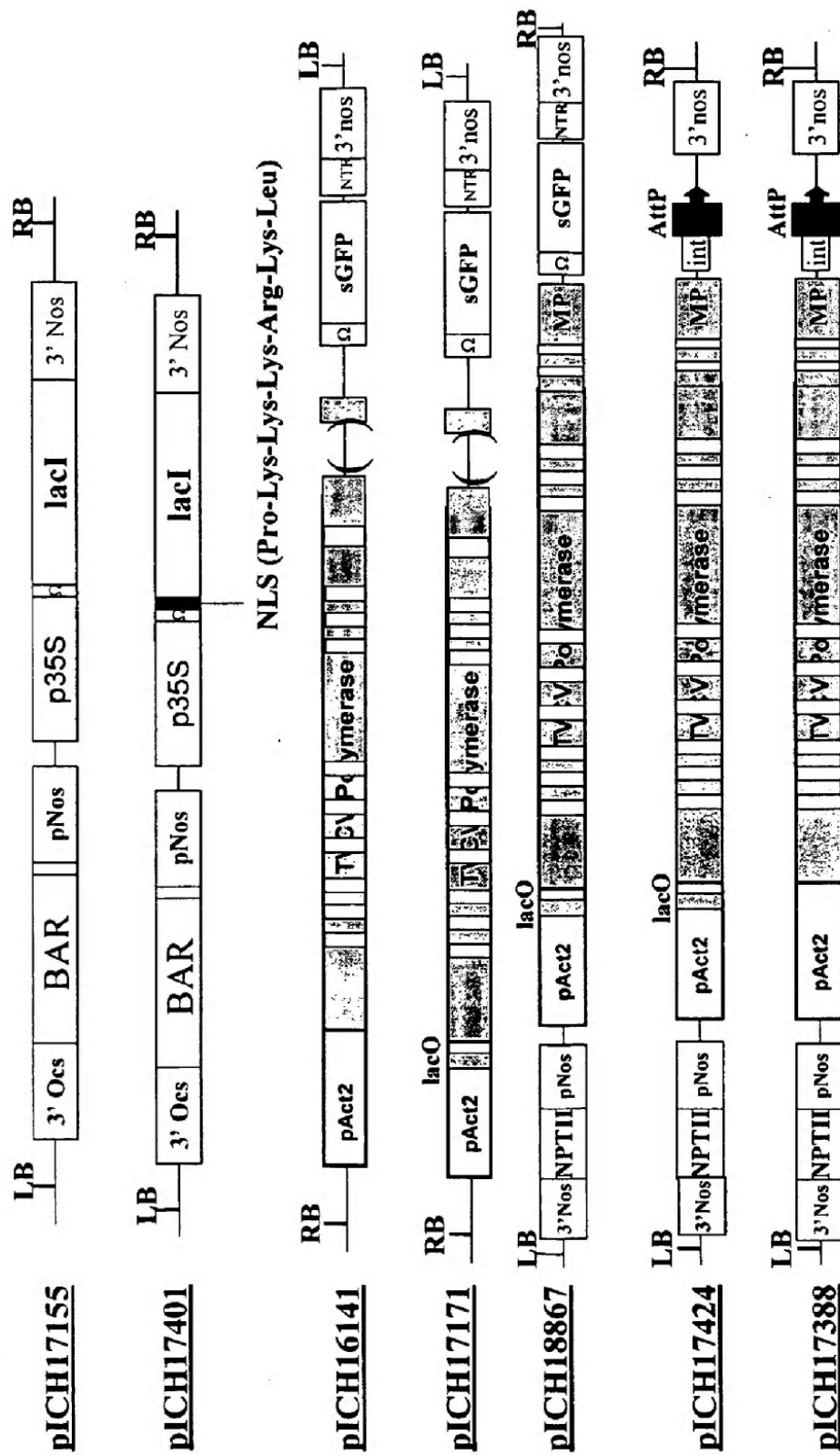
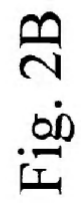


Fig. 2A



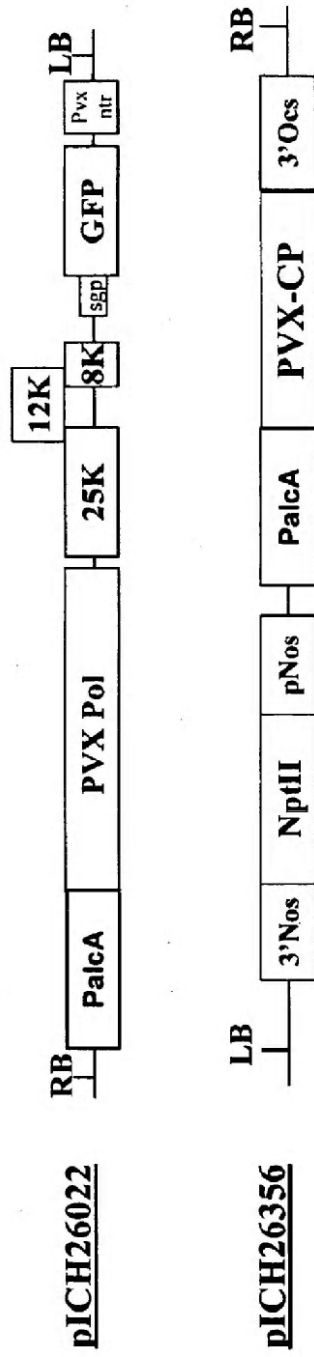


Fig. 2C

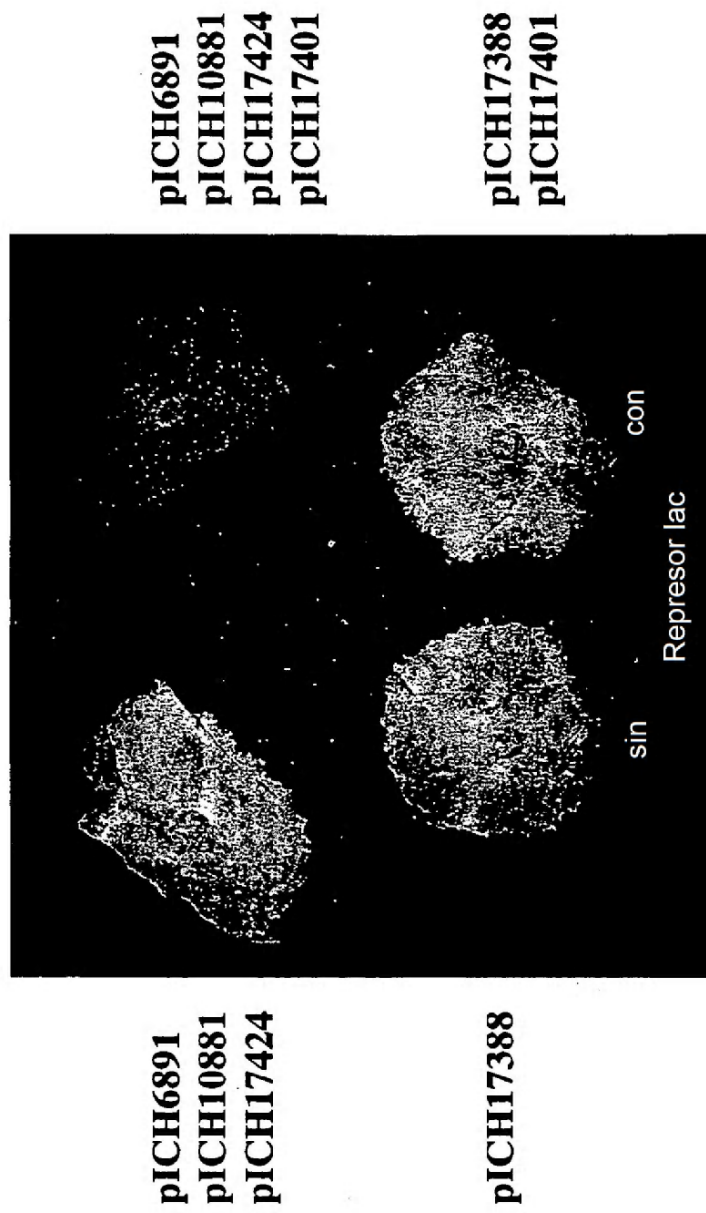


Fig. 3

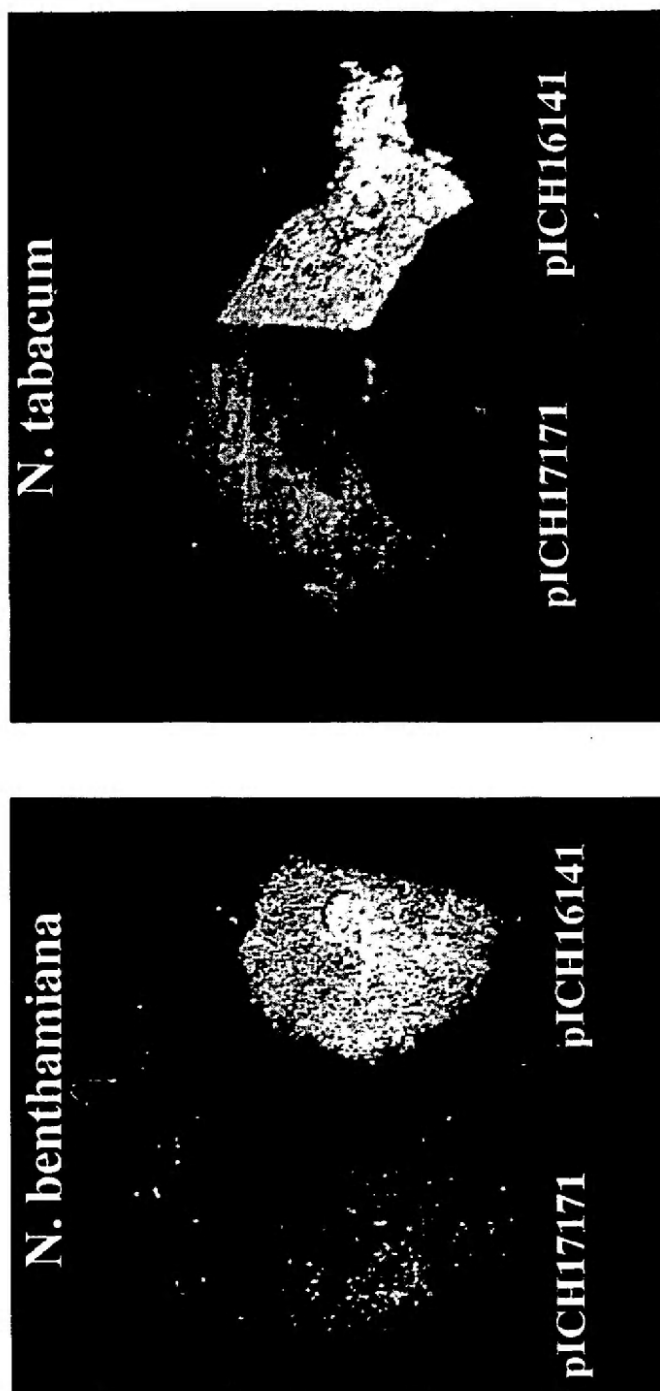


Fig. 4A

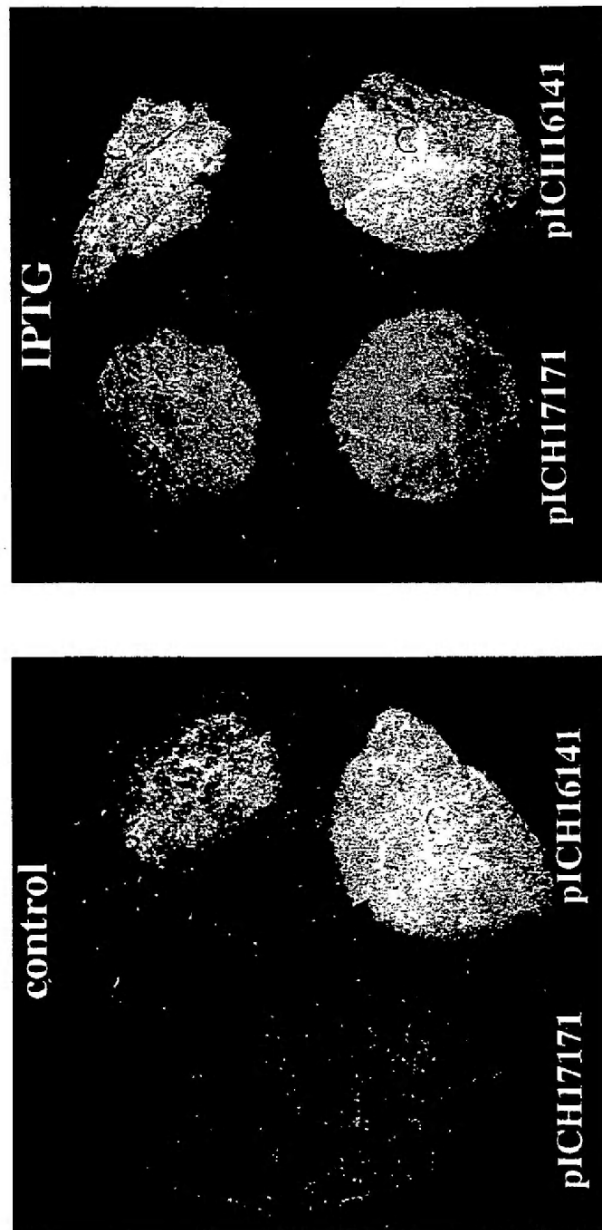


Fig. 4B

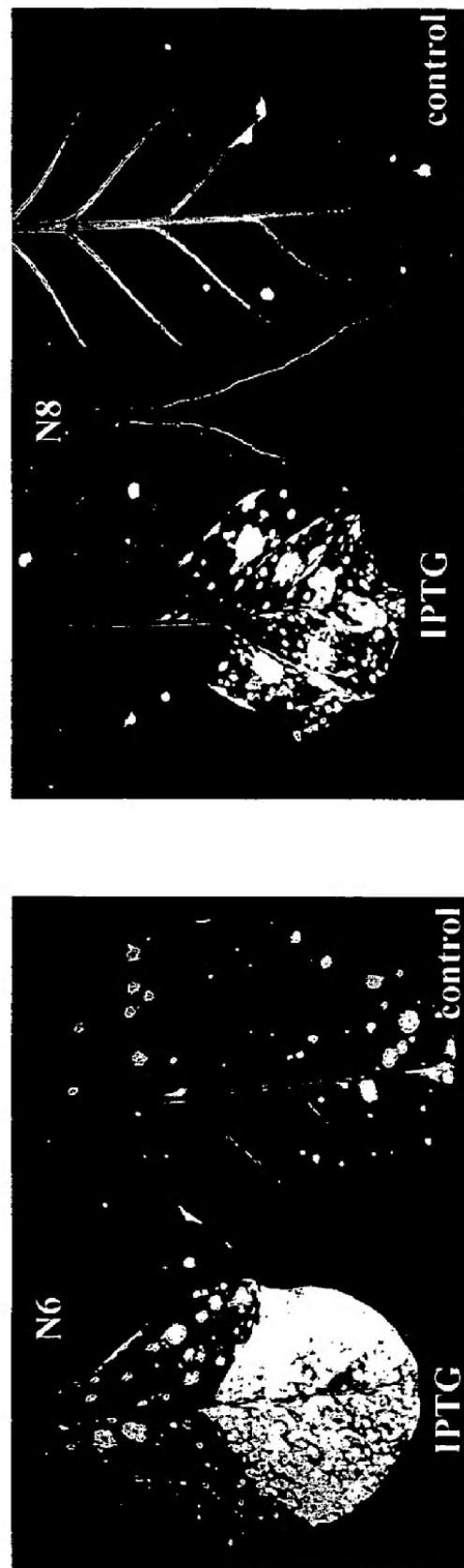


Fig. 5

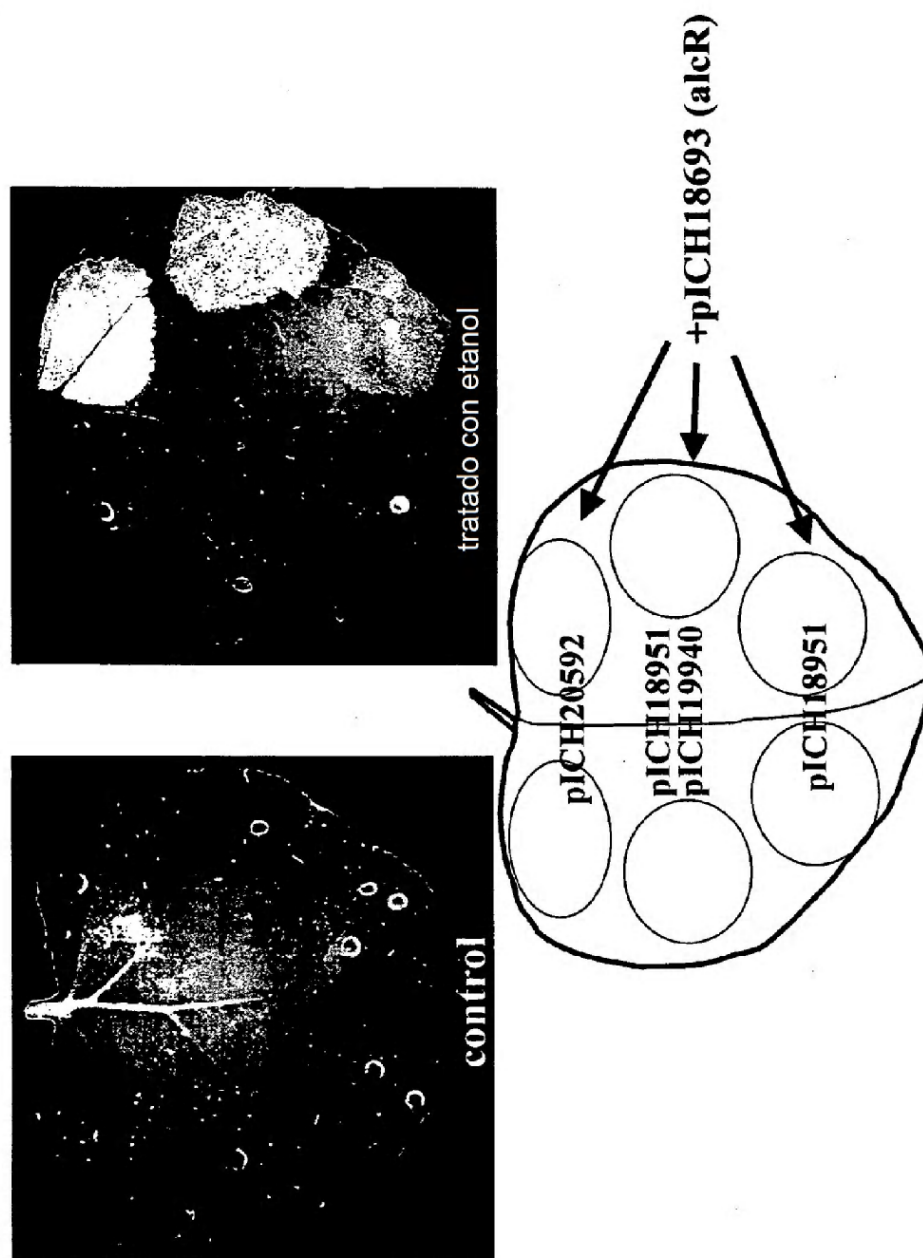


Fig. 6

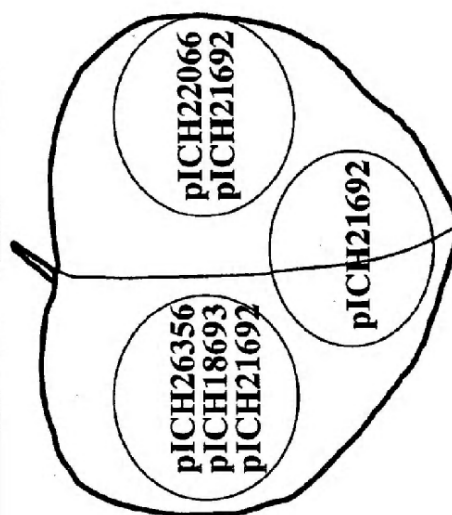
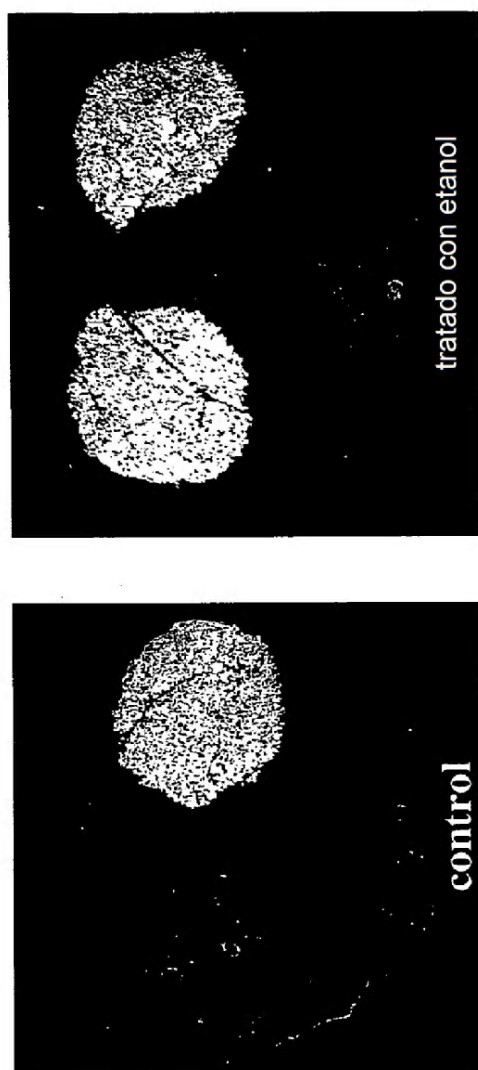


Fig. 7

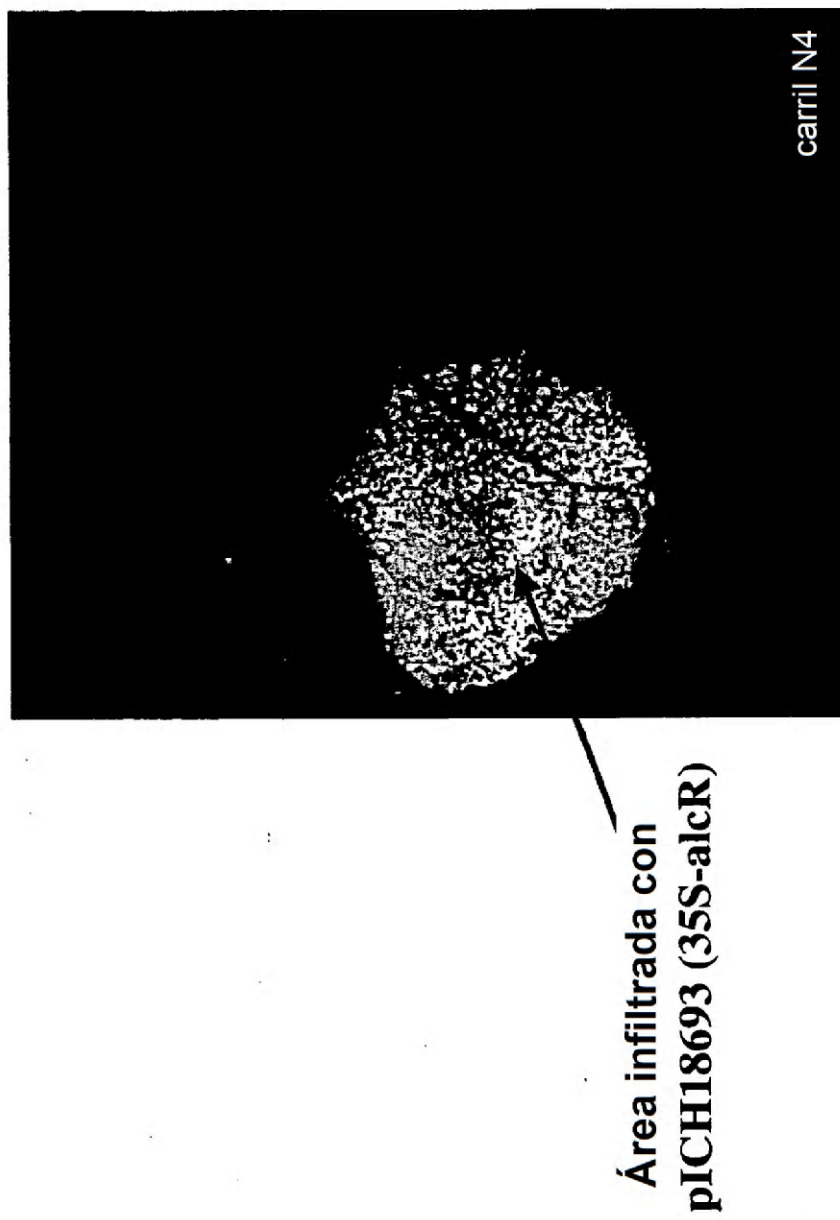


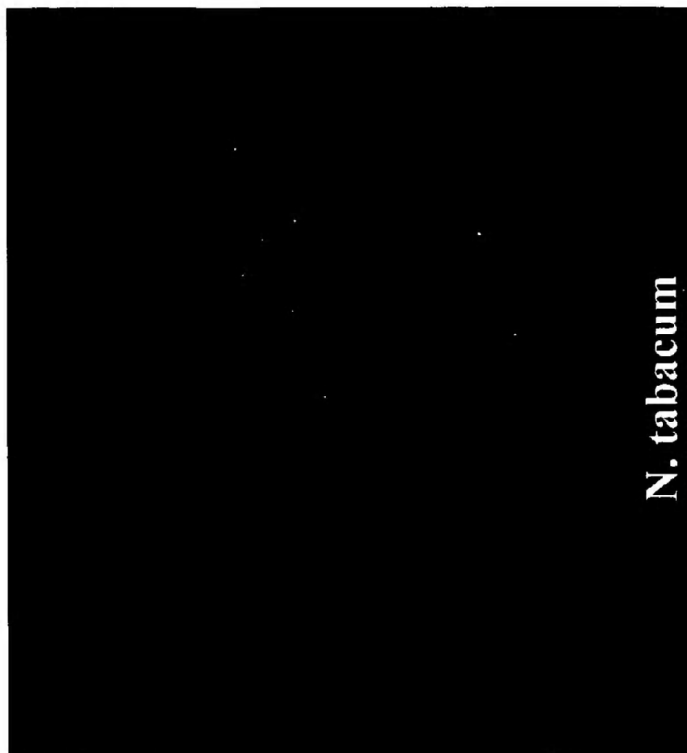
Fig. 8

pICH18951 x pICH18693



Fig. 9

pICH20592 x pICH18693



N. tabacum

Fig. 10

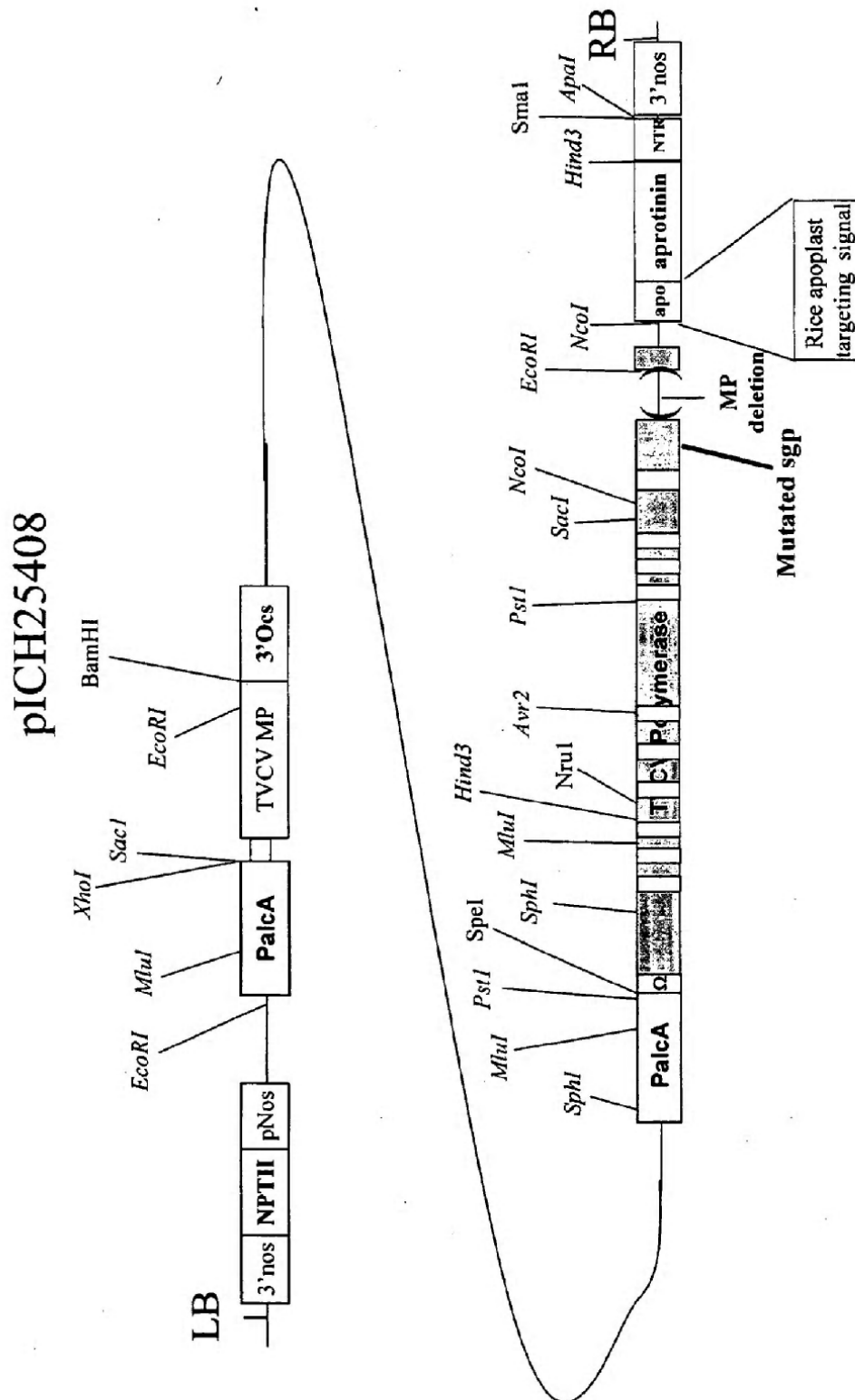
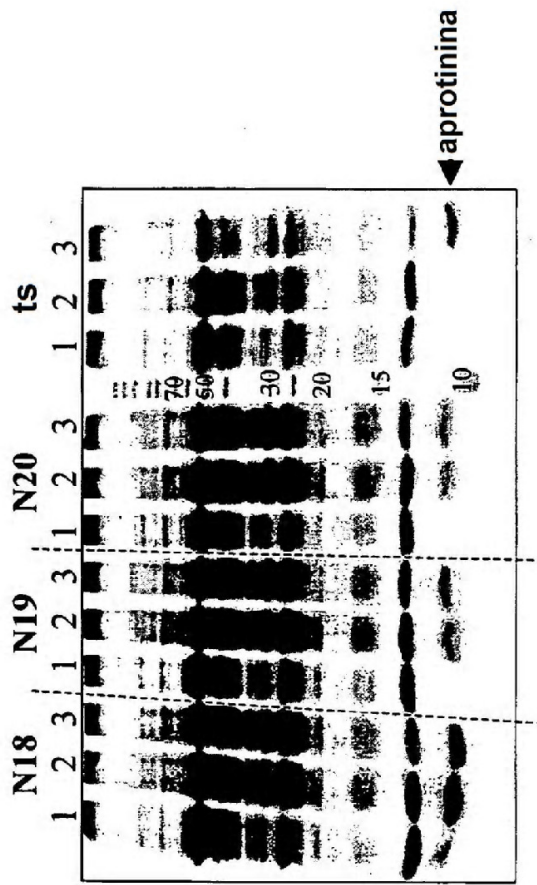


Fig. 11



- 1: control no infiltrado
- 2: infiltración de ensayo (alcR; pICH18693)
- 3: infiltración de control (alcR + vector viral; pICH18693 + pICH25408)

Fig. 12

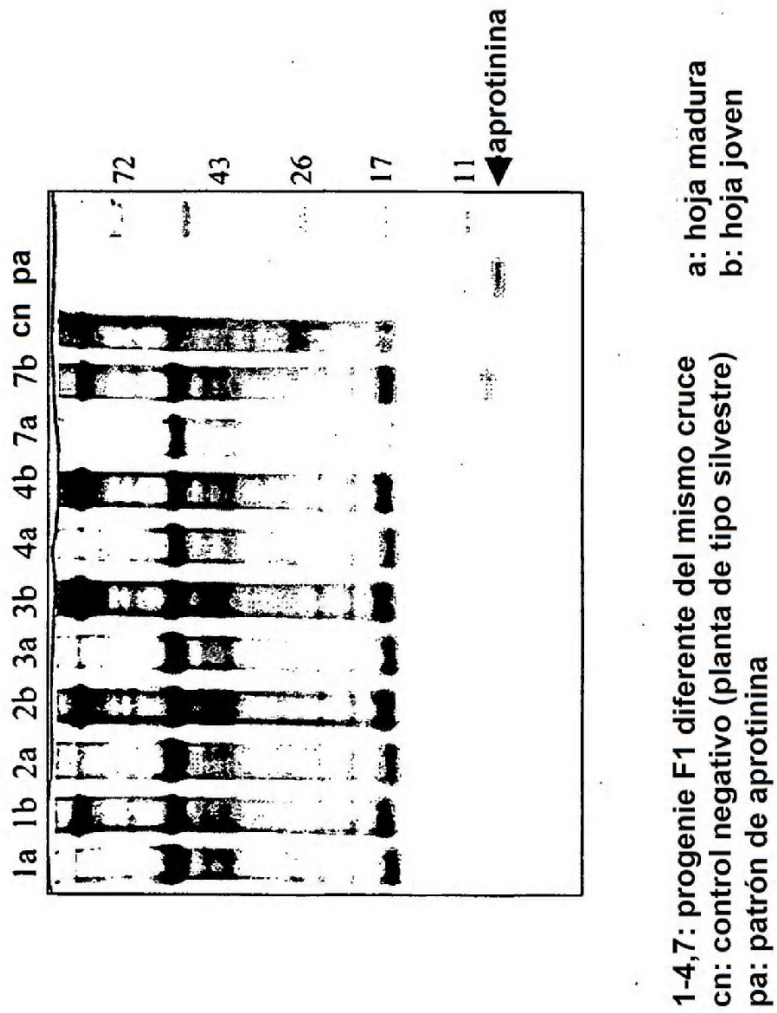


Fig. 13