

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 783**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07802182 .1**
96 Fecha de presentación: **06.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2061890**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **Replicón derivado de potexvirus**

30 Prioridad:
06.09.2006 EP 06018713

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**ICON GENETICS GMBH (100.0%)
BRIENNERSTRASSE 12A
80333 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:
**MARILLONNET, SYLVESTRE;
ENGLER, CAROLA;
KLIMYUK, VICTOR y
GLEBA, YURI**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 389 783 T3

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

DESCRIPCIÓN

Replicón derivado de potexvirus

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso de expresión de alta producción de un gen de interés en una planta, en tejido de planta o en células de planta usando un replicón derivado de potexvirus y a un ácido nucleico que comprende o que codifica un replicón de ARN potexviral que puede utilizarse para expresar un gen de interés. La invención también se refiere a un kit de partes que comprende dos o más vectores que juntos codifican el replicón de ARN de la invención.

Antecedentes de la invención

La expresión de alta producción de proteínas heterólogas en plantas puede lograrse usando vectores virales. Los sistemas de vectores viral se desarrollaron predominantemente para la expresión transitoria seguida por la infección (Donson et al., 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88:7204-7208; Chapman, Kavanagh & Baulcombe, 1992, Plant J., 2:549-557) o la transfección (Marillonnet et al., 2005, Nat Biotechnol., 23:718-723; Santi et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A. 103:861-866; documento WO02005/049839) de un huésped de planta. Los sistemas mejor establecidos y comercialmente disponibles se basan en virus de ARN monocatenario de sentido positivo, preferiblemente en vectores derivados del Virus del Mosaico del tabaco (TMV) (Kumagai et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 427-430; Mallory et al., 2002, Nature Biotechnol. 20, 622-625; documentos US5316931; US5589367; US5866785; US5977438; WO02088369; WO02097080; WO0229068; US5491076).

Otro grupo de vectores basados en virus de ARN derivados del potexvirus PVX (virus X de la patata) también puede proporcionar una producción razonablemente alta de proteínas recombinantes, aunque una producción notablemente menor que los vectores derivados del TMV (Chapman, Kavanagh & Baulcombe, 1992, Plant J., 2:549-557; Baulcombe, Chapman & Santa Cruz, 1995, Plant J., 7:1045-1053; Zhou et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol., 13 Abril, Pub antes de impresión; Zelada et al., 2006, Tuberculosis, 86:263-267). Obviamente, tal sistema necesita más desarrollo para aumentar la producción de la proteína de interés recombinante.

En la primera generación de vectores virales sistémicos, se gastó una gran proporción de recursos de plantas para la producción de la proteína de recubrimiento viral que es necesaria para el movimiento sistémico de un replicón viral. Para los vectores derivados del TMV (Virus del Mosaico del Tabaco) este problema se resolvió eliminando el gen de la proteína de recubrimiento y mediante el uso de agro infiltración para la administración sistémica eficaz de los replicones, reforzando así significativamente la producción de proteínas de interés recombinantes (WO2005/049839; Marillonnet et al., (2005), Nat. Biotechnol., 23:718-723). Sin embargo, a diferencia de los replicones derivados del TMV, los replicones derivados de potexvirus requieren la proteína de recubrimiento viral no solamente para el movimiento sistémico, sino también para el de corta distancia (de célula a célula). Por lo tanto, el gen de la proteína de recubrimiento de los vectores virales derivados de potexvirus no puede eliminarse sin una grave pérdida de la eficacia de la expresión de la proteína. Además, la modificación genética del hospedador de planta que proporcione proteína de recubrimiento viral *en trans* es raramente una buena solución debido al silenciamiento génico. Además, las plantas transgénicas que expresan la proteína de recubrimiento podrían presentar resistencia mediada por la proteína de recubrimiento a exposiciones por virus de planta (Beachy, RN., 1999, Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci, 354:659-664; Wisniewski et al., 1990, Plant Cell, 2:559-567). Otro fenómeno similar, denominado resistencia mediada por la CP heteróloga, puede ser un problema, por ejemplo, cuando una planta transgénica que expresa la CP del PVX reduce la propagación de célula a célula del ARN del TMV (Bazzini et al., 2006, J. Gen. Virol., 87:1005-1012). Además, la expresión de la proteína de recubrimiento del PVX en plantas de tabaco transgénicas recupera al PVX del movimiento deficiente, pero compromete la eficacia del movimiento de célula a célula y la replicación viral (Spillane et al., 1997, Virology, 236:76-84). Esto podría ser un problema cuando se requiere el uso de dos vectores virales (por ejemplo, vectores basados en el TMV y en el PVX), en la misma célula de planta, para la expresión de proteínas hetero-oligoméricas (por ejemplo, para la expresión conjunta de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo monoclonal) (documento WO2006/079546; Giritich et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci USA, en prensa).

Descripción general de la invención

Es por lo tanto un objetivo de la invención proporcionar un vector viral basado en potexvirus para la expresión de alta producción de una proteína de interés en plantas, en tejido de plantas o en células de plantas. El vector viral debería poder moverse de célula a célula y para producir la proteína de recubrimiento viral apenas debería consumir los recursos de un hospedador de planta.

Este objetivo se resuelve mediante un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

También se describe un ácido nucleico que comprende o que codifica un replicón de ARN que comprende, en este orden, los siguientes segmentos:

- 5 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifique una ARN polimerasa dependiente de ARN o un derivado conservador de la función de la misma;
- (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprenda un bloque genético triple de potexvirus o una variante conservadora de la función del mismo y una proteína de recubrimiento potexviral o una variante conservadora de la función de la misma;
- 10 (iii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que pueda expresarse a partir de dicho replicón en una planta o en un tejido de planta;

o una secuencia complementaria de los mismos.

15 Adicionalmente se describe un ácido nucleico que comprende o codifica un replicón de ARN que comprende, en este orden, los siguientes segmentos:

- (i) una secuencia de ácido nucleico que codifique una ARN polimerasa de ARN dependiente de ARN o un derivado conservador de la función de la misma;
- 20 (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprenda un bloque genético triple de potexvirus o una variante conservadora de la función del mismo y una proteína de movimiento tobamoviral; y
- (iii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que pueda expresarse a partir de dicho replicón en una planta o en un tejido de planta;

25 o una secuencia complementaria de los mismos.

Dicho replicón de ARN puede ser un replicón para replicar y expresar dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo en una planta o tejido de planta. Dicho replicón de ARN puede construirse en un potexvirus y usa el sistema de replicación y expresión de un potexvirus para expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo.

30 El ácido nucleico de la invención puede ser un ácido nucleico aislado, o uno aislado y purificado. El ácido nucleico de la invención se usa típicamente como un vector para transfectar o transformar una planta o células de plantas.

35 La invención también proporciona un kit de partes, que comprende al menos dos vectores (provectores) que, en células de planta, por recombinación dirigida a sitio, pueden ensamblar dicho ácido nucleico de la invención.

La invención también proporciona un procedimiento para la expresión de una secuencia de interés de ácido nucleico heterólogo en una planta o en un tejido de planta, que comprende proporcionar una planta o tejido de planta con dicho ácido nucleico de la invención. La invención también proporciona un procedimiento para la expresión de una secuencia de interés de ácido nucleico heterólogo en una planta o tejido de planta, que comprende proporcionar una planta o tejido de planta con dos o más vectores que sean capaces de ensamblar dicho ácido nucleico de la invención en células de planta por recombinación dirigida al sitio.

45 De manera sorprendente los autores de la invención han identificado un modo para aumentar la producción de la expresión de una proteína de interés que se expresa en una planta o en un tejido de planta, a partir de un vector potexviral mediante un diseño vectorial en el que las secuencias, como se definen en el punto (ii), se posicionan (cadena abajo en la dirección de 5 a 3') después de la secuencia codificante de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o RdRP, por las siglas en inglés *RNA-dependent RNA polymerase*) del punto (i) y preceden a dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo del punto (iii). En el caso especial de vectores potexvirales, este diseño vectorial conduce a una capacidad de movimiento de célula a célula del replicón de ARN y, al mismo tiempo, a niveles de expresión más altos del ácido nucleico heterólogo en comparación con los vectores potexvirales convencionales en los que un ácido nucleico heterólogo se colocó cadena arriba del gen de proteína de recubrimiento potexviral. El efecto identificado por los inventores puede deberse al hecho de que la posición de las secuencias del punto (ii) conduce a niveles de expresión más bajos de estas proteínas y a un menor consumo de los recursos de la planta para la expresión de estas proteínas, permitiendo niveles de expresión más altos de la proteína 3' de interés. De manera importante, el nivel de expresión limitado de la proteína de recubrimiento potexviral en la invención es suficiente para soportar el movimiento eficaz de célula a célula para la alta producción de la expresión de la secuencia de interés heteróloga.

60 Los potexvirus son virus de ARN de planta con un genoma monocatenario de sentido positivo. Por lo tanto, dicho ácido nucleico de la invención puede ser ARN que sea, o que comprenda, dicho replicón de ARN, o puede ser ADN que codifique a ese replicón de ARN. En el presente documento, las expresiones "vector potexviral" o "replicón potexviral"

significan que el vector o el replicón hacen uso del sistema de replicación y de expresión de la proteína de los potexvirus. Dicho ácido nucleico puede construirse en un potexvirus natural, usando, por ejemplo, componentes genéticos de un potexvirus. Dicho ácido nucleico de la invención puede obtenerse insertando dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo en una construcción de ácido nucleico que codifique un potexvirus, de modo que dicha secuencia de interés de ácido nucleico heterólogo se inserta cadena abajo de una secuencia que codifica la proteína de recubrimiento del potexvirus. Sin embargo, pueden hacerse varias modificaciones a los diversos componentes genéticos de un potexvirus natural, tal como al gen de la RdRp, al bloque genético triple, al gen de la proteína de recubrimiento, o a las regiones 5' o 3' no traducidas de un potexvirus, para los que se muestran ejemplos más adelante.

Dicho replicón de ARN de la invención comprende, en el orden desde el extremo 5' hacia el extremo 3', dichos segmentos (i) a (iii) de la invención. Otros elementos genéticos estarán típicamente presentes en dicho replicón para la replicación y la expresión. Para ser un replicón de ARN, es decir, para la replicación autónoma en una célula de planta, dicho replicón de ARN codifica una RdRp o un derivado de conservación de la función de la misma. Dicho replicón de ARN también puede tener regiones potexvirales 5'- ó 3'- no traducidas y secuencias promotoras en la región 5'- ó 3'- no traducida de dicho replicón de ARN para unir dicha RdRp y para replicar dicho replicón de ARN. Dicho replicón de ARN también puede tener promotores subgenómicos en los segmentos del punto (ii) y (iii) para generar los ARN subgenómicos para la expresión de las proteínas codificadas por los segmentos de los elementos (ii) y (iii). Si dicho ácido nucleico es ADN, típicamente tendrá un promotor de transcripción para permitir la producción por transcripción de dicho replicón de ARN in vitro o en la planta. Un ejemplo de un promotor de transcripción que permite la transcripción de dicho replicón de ARN de un ácido nucleico de ADN en la planta es el promotor 35S que se usa ampliamente en la biotecnología de plantas.

Dicho segmento (i) puede codificar una RdRp de un potexvirus, tal como el virus X de la patata, o una variante conservadora de la función de dicha RdRp del potexvirus. La RdRp usada en dicho replicón de ARN puede considerarse como una variante conservadora de la función de una RdRp potexviral, si dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tenga una identidad de secuencia de al menos 36% con respecto a una proteína codificada por la SEC ID NO:4 dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoácidos. En otra realización, dicha identidad de secuencia es al menos de 45%, en otra realización es al menos de 55%, en otra realización es al menos de 65% y en otra realización más, es al menos 75% con respecto a una proteína codificada por la SEC ID NO: 4. Estas identidades de secuencia pueden estar presentes sobre toda la secuencia de la SEC ID NO: 4. Como alternativa, estas identidades de secuencia pueden estar presentes dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 500 restos aminoácidos, dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 900 restos aminoácidos, o dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 1400 restos aminoácidos.

En el presente documento, las identidades de secuencia de aminoácido pueden determinarse usando BLASTX2.2.14, usando los ajustes convencionales. Los ajustes convencionales permiten, por ejemplo, espacios de secuencia en las alineaciones.

En un ejemplo, dicha identidad de secuencia entre una proteína codificada por la SEC ID NO: 4 y una variante conservadora de la función de una RdRp de potexvirus es de 45% en un segmento de secuencia de proteína de al menos 900 restos aminoácidos. En otro ejemplo, dicha identidad de secuencia entre una proteína codificada por la SEC ID NO: 4 y una variante conservadora de la función de una RdRp de potexvirus es de 55% en un segmento de secuencia de proteína de al menos 900 restos aminoácidos.

Como alternativa, la RdRp usada en dicho replicón de ARN puede considerarse una variante conservadora de la función de una RdRp potexviral si dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una homología de secuencia de al menos 50% con respecto a una proteína codificada por la SEC ID NO:4. En otra realización, dicha homología de secuencia es de al menos 60%, en una realización adicional es de al menos 70% y en otra realización es de al menos 80% con respecto a una proteína codificada por la SEC ID NO:4. Estas homologías de secuencia pueden estar presentes en toda la secuencia de la SEC ID NO: 4. Como alternativa estas homologías de secuencia pueden estar presentes en un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoácidos, al menos 500 restos aminoácidos, al menos 900 restos aminoácidos, o al menos 1400 restos aminoácidos. Las homologías de secuencia de aminoácido pueden determinarse usando BLASTX 2.2.14, usando los ajustes convencionales. Los ajustes convencionales permiten, por ejemplo, espacios de secuencia en las alineaciones.

En un ejemplo, dicha homología de secuencia entre una proteína codificada por la SEC ID NO: 4 y una variante conservadora de la función de una RdRp de potexvirus es de 70% en un segmento de secuencia de proteína de al menos 900 restos aminoácidos. En otro ejemplo, dicha identidad de secuencia entre una proteína codificada por la SEC ID NO: 4 y una variante conservadora de una RdRp de potexvirus es de 80% en un segmento de secuencia de proteína de al menos 900 restos aminoácidos.

5 Como alternativa, la RdRp usada en dicho replicón de ARN puede considerarse una variante conservadora de la función de una RdRp potexviral si dicha secuencia del punto (i) tiene una identidad de secuencia de al menos 55%, de al menos 60%, o de al menos 70% con respecto a la SEC ID NO:4. Dichas identidades de secuencia pueden estar presentes dentro de la SEC ID NO: 4, o dentro de un segmento de secuencia de al menos 900 nucleótidos, dentro de un segmento de secuencia de al menos 1500 nucleótidos, dentro de un segmento de secuencia de la menos 2000 nucleótidos, o dentro de un segmento de secuencia de al menos 4200 nucleótidos de la SEC ID NO: 4. Las identidades de secuencia de nucleótido pueden determinarse usando BLASTN 2.2.14, usando los ajustes convencionales. Los ajustes convencionales permiten, por ejemplo, espacios de secuencia en las alineaciones.

10 Dicho replicón de ARN comprende dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii) para permitir el movimiento de célula a célula de dicho replicón de ARN en una planta o en el tejido de una planta. El movimiento de célula a célula de dicho replicón de ARN es importante para lograr la expresión de la secuencia del punto (iii) en tantas células como sea posible de dicha planta o de dicho tejido. Dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii) comprende el bloque genético triple potexviral (en el presente documento abreviado como 'TGB') o una variante conservadora de la función del mismo, como se define en la reivindicación 1 (una revisión del TGB se encuentra en J. Gen. Virol. (2003) 84, 1351, 1366). El bloque genético triple potexviral codifica tres proteínas necesarias para proporcionar la capacidad de movimiento de célula a célula a un potexvirus. Por lo tanto, se considera que una variante de dicho TGB es una variante conservadora de la función del TGB si la variante puede proporcionar, opcionalmente con otros componentes necesarios, el replicón de ARN de la invención con la capacidad de movimiento de célula a célula en una planta o en un tejido de planta.

15 20 Un ejemplo de un TGB potexviral es el TGB del virus X de la patata (denominado en el presente documento 'TGB del PVX'). El TGB del PVX consta de tres genes que codifican tres proteínas denominadas 25K, 12K, y 8K, de acuerdo con su peso molecular aproximado. Las secuencias génicas que codifican la proteína 25K del PVX, la proteína 12K del PVX, y la proteína 8K del PVX se proporcionan en la SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, y SEC ID NO:13, respectivamente. Las secuencias de proteína de la proteína 25K del PVX, de la proteína 12K del PVX y de la proteína 8K del PVX se proporcionan en la SEC ID NO:10, SEC ID NO:12, y SEC ID NO:14, respectivamente.

25 30 En una realización, dicha variante conservadora de la función de un TGB de potexvirus codifica tres proteínas, una de las cuales tiene una identidad de secuencia de al menos 40% con la proteína 25K del PVX, una que tiene una identidad de secuencia de al menos 40% con la proteína 12K del PVX y una que tiene una identidad de secuencia de al menos 40% con la proteína 8K de PVX. En otra realización, dicha variante conservadora de la función de un TGB de potexvirus codifica tres proteínas, una de las cuales tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la proteína 25K del PVX, una que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la proteína 12K del PVX, y una que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la proteína 8K de PVX. En otra realización, los valores correspondientes de identidad de secuencia son de 60% para cada proteína. En otra realización, los valores correspondientes de identidad de secuencia son del 70% para cada proteína.

35 40 Dicha variante conservadora de la función de un TGB de potexvirus codifica las tres proteínas siguientes: una primera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200 restos aminoácidos, teniendo dicho segmento una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la proteína 25K del PVX; una segunda proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 100 restos aminoácidos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la proteína 12K del PVX; y una tercera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 55 restos aminoácidos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la proteína 8K del PVX. En otra realización, los valores correspondientes de identidad de secuencia son de 50% para cada proteína. En otra realización, los valores correspondientes de identidad de secuencia son de 60% para cada una de dicha primera, segunda y tercera proteína.

45 50 Dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii) puede comprender una secuencia adicional que codifica una proteína necesaria para el movimiento de célula a célula de dicho replicón de ARN, como se define en la reivindicación 1, tal como una proteína de recubrimiento potexviral o una variante conservadora de la función de la misma. Una variante de dicha proteína de recubrimiento potexviral se considera una variante conservadora de la función de dicha proteína de recubrimiento, si puede proporcionar dicho replicón de ARN, junto con otros componentes necesarios tales como el TGB, con la capacidad de movimiento de célula a célula en una planta o en el tejido de una planta. En una realización en la que dicho replicón de ARN comprende una proteína de recubrimiento potexviral (o una variante conservadora de la función de la misma), dicho replicón de ARN no tiene un origen de ensamblaje de partícula viral para evitar la propagación de dicho replicón de ARN de planta a planta en la forma de un virus de planta ensamblado. Si dicho replicón de ARN comprendiese un gen de proteína de recubrimiento potexviral (o una variante conservadora de la función del mismo) y un TGB (o una variante conservadora de la función del mismo), es posible que dicho TGB se ubique cadena arriba de dicho gen de proteína de recubrimiento, o viceversa. Por lo tanto, dicho gen de proteína de recubrimiento potexviral (o una variante conservadora de la función del mismo) y dicho TGB (o una variante conservadora de la función

55 60

del mismo) pueden estar presentes en cualquier orden en dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii).

La secuencia codificante de una proteína de recubrimiento de PVX se proporciona como SEC ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de la proteína de recubrimiento de PVX se proporciona como SEC ID NO: 8. Una proteína se considera una variante conservadora de la función de una proteína de recubrimiento potexviral si comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200, preferentemente de al menos 220, más preferentemente 237 restos aminoácidos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de secuencia de al menos 35% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO: 8. En otra realización, una proteína se considera una variante conservadora de la función de una proteína de recubrimiento potexviral si comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200, como alternativa de al menos 220, también como alternativa de 237 restos aminoácidos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de secuencia de al menos 45% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:8. En realizaciones alternativas, los valores correspondientes de identidad de secuencia son de 55% ó 65%.

Como alternativa, dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii) puede comprender opcionalmente, en lugar de dicha secuencia que codifica dicha proteína de recubrimiento potexviral, una secuencia que codifique una proteína de movimiento (MP) tobamoviral tal como una MP del virus del mosaico del tabaco o una MP del virus del aclaramiento de las nervaduras del nabo. Dicha secuencia que codifica una proteína de movimiento viral y dicho TGB de potexvirus (o una variante conservadora de la función de los mismos) pueden estar presentes en cualquier orden en dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii).

Dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo del punto (iii) comprende típicamente la secuencia codificante de una proteína de interés que va a expresarse en una planta o en el tejido de la planta. En el presente documento, dicha secuencia codificante del punto (iii) también se denomina gen de interés. Dicha secuencia del punto (iii) es heteróloga para dicho virus de planta en el cual se basa dicho replicón de ARN. En muchos casos, dicha secuencia también es heteróloga para dicha planta o dicho tejido de planta en el cual va a expresarse. Para ser que puede expresarse a partir de dicho replicón de ARN en una planta o en el tejido de planta, dicha secuencia del punto (iii) comprende típicamente un promotor subgenómico y otras secuencias necesarias para la expresión tales como el sitio de unión del ribosoma y/o un sitio interno de entrada del ribosoma(IRES). En una realización preferida, dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo del punto (iii) tiene un gen de interés que codifica una proteína de interés.

Dicho ácido nucleico de la invención puede comprender una región 5' no traducida de potexvirus (5'-NTR) y una región 3' no traducida de potexvirus (3'-NTR).

El procedimiento de la invención puede usarse para producir una proteína de interés o más de una proteína de interés en una planta o en un tejido de planta. Dicho procedimiento comprende proporcionar una planta, un tejido de planta o células de planta con dicho ácido nucleico de la invención. El procedimiento de la invención se realiza preferiblemente en plantas o en tejido de plantas. En una realización, dicho procedimiento es un procedimiento de expresión transitoria, por lo que la incorporación del ácido nucleico de la invención en el ADN cromosómico de la planta hospedadora no es necesaria.

Si dicho ácido nucleico de la invención es ARN, este puede usarse para infectar una planta o tejido de planta, preferiblemente en combinación con daño mecánico del tejido de la planta infectada, tal como las hojas. En otra realización, dicho ácido nucleico de la invención es ADN y dicho ADN puede introducirse en las células de una planta o en el tejido de planta, por ejemplo, mediante bombardeo de partículas o por transformación mediada por *Agrobacterium*. La transformación mediada por *Agrobacterium* es el método de elección si con el ácido nucleico de la invención van a proporcionarse varias plantas, es decir, para los métodos de producción de proteína a gran escala.

El procedimiento de la invención puede realizarse usando la estrategia pro-vector (documento WO02088369; Marillonnet et al, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 101:6852-6857), proporcionando una planta o tejido de planta con dicho kit de partes de la invención. Después, en las células de dicha planta, se produce el ácido nucleico de la invención por recombinación específica de sitio entre pro-vectores. En una realización, se proporcionan a una planta o a un tejido de planta un primer vector (pro-vector) que comprende o que codifica segmentos de los elementos (i) y (ii) y un segundo vector (pro-vector) que comprende o que codifica el segmento del punto (iii), en el que cada uno de dicho primer y segundo pro-vector tienen un sitio de recombinación para permitir el ensamblaje de un ácido nucleico de la invención por recombinación específica de sitio entre dicho primer y segundo pro-vector. A una planta o tejido de planta pueden proporcionarse dos o más vectores, proporcionando a la planta o tejido de planta mezclas de los vectores o mezclas de cepas de *Agrobacterium*, conteniendo cada cepa uno de dichos vectores.

Dicha una, o más de una, proteína de interés, pueden purificarse después de la producción en dicha planta o tejido de planta. En la técnica se conocen métodos de purificación de proteínas a partir de plantas o células de plantas. En un método, una proteína de interés puede dirigirse al apoplasto de una planta y purificarse a partir del mismo, como se describe en el documento WO 03/020938.

Si tiene que producirse una proteína de interés, en dicha secuencia nucleotídica que codifica dicho replicón de ARN, puede incluirse una secuencia nucleotídica que codifique dicha proteína de interés. Si en la misma planta o en el mismo tejido de planta tienen que producirse dos o más proteínas de interés, dicha planta o células de planta pueden proporcionarse con un segundo ácido nucleico que comprenda o que codifique un segundo o adicional replicón de ARN. Después, dicho replicón de ARN adicional puede codificar una o más proteínas adicionales de interés. En una realización, un primer y un segundo ácido nucleico de la invención pueden comprender o codificar replicones de ARN no competidores, como se describe en el documento WO2006/079546.

En principio la presente invención puede aplicarse a cualquier planta para la cual exista potexvirus infecciosos y para la cual se establecieron sistemas de vector viral. En una realización, se usan plantas dicotiledóneas o tejido o células de las mismas. En otra realización se usan especies de *Nicotiana* como *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*; las especies preferidas de plantas distintas de las especies de *Nicotiana* son *Petunia hybrida*, *Brassica campestris*, *B. juncea*, berro, rúcula, mostaza, espinaca fresa, *Chenopodium capitatum*, alfalfa, lechuga, girasol, patata y pepino. Los virus de ARN de planta más preferidos que infectan replicones de ARN de la invención pueden basarse en potexvirus tales como el virus X de la patata (PVX), el potexvirus del mosaico de la papaya o el potexvirus del mosaico del bambú.

La aplicación principal de la presente invención es la producción de una proteína de interés en plantas, hojas de planta o cultivo de tejido o células de planta. Si el procedimiento de la invención se realiza en plantas, se prefieren las plantas que no entran en la cadena alimentaria humana o animal, como las especies de *Nicotiana*. Las plantas que no entran en la cadena alimentaria humana o animal pueden cultivarse en un campo abierto y cosecharse en un determinado periodo después de la infección con dicho replicón de ARN. Preferiblemente, se confinarán plantas enteras o partes de planta en un ambiente cerrado, por ejemplo, un invernadero o una cámara diseñada durante el periodo de incubación necesario para proporcionar el nivel de expresión deseado.

La eficacia del procedimiento de producción de la presente invención es tal que se obtiene una nueva dimensión en los sistemas de expresión de las plantas. Los niveles de expresión que se logran con la presente invención son tales que los gastos para el procedimiento cadena abajo (incluyendo la separación y la purificación de la proteína de interés) son lo suficientemente bajos para hacer al procedimiento de la invención competitivo con otros sistemas de expresión a gran escala. La invención proporciona el primer sistema de expresión potexviral de alta producción en plantas que puede usarse a gran escala.

Realizaciones ventajosas de la invención

Las realizaciones preferidas, como se describen en las reivindicaciones dependientes o como se describen en el presente documento, pueden combinarse. Por ejemplo, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende o que codifica un replicón de ARN que comprende, en este orden, los siguientes segmentos (i) a (iii):

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN de potexvirus o una variante conservadora de la función de la misma;

(ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende:

(a) un bloque genético triple de potexvirus o una variante conservadora de la función del mismo, y

(b) una secuencia que codifique una proteína de recubrimiento potexviral o una variante conservadora de la función de la misma; y

(iii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que puede expresarse a partir de dicho replicón en una planta o un tejido de planta;

en el que dicha variante conservadora de la función del bloque genético triple de potexvirus codifica las tres proteínas siguientes: una primera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:10; una segunda proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 100 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:12; y una tercera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 55 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:14; en el que dicha variante conservadora de la función de la proteína de recubrimiento potexviral comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de secuencia de al menos 35% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:8; y en el que dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 36% con una proteína codificada por la

SEC ID NO:4; dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoácidos, preferiblemente al menos 500 restos aminoácidos, más preferiblemente al menos 900 restos aminoácidos, y lo más preferible, al menos 1400 restos aminoácidos.

- 5 Los valores de identidad de secuencia proporcionados en la realización anterior pueden cambiarse por valores de identidad más específicos y/o por segmentos de secuencia más largos, como se desvela en la descripción general de la invención. Además, la realización anterior puede combinarse con realizaciones preferidas como se definen en las reivindicaciones dependientes o como se describen en esta descripción. El ácido nucleico anterior puede usarse en un proceso de expresión de una secuencia de interés de ácido nucleico heterólogo en una planta o un tejido de planta, tal como en plantas de *Nicotiana* o en tejidos de plantas de *Nicotiana* o en células de las mismas.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1. A - Plantas de *N. benthamiana* (imagen izquierda) y hojas de planta (imagen derecha) observadas con luz UV después de la agro infiltración con diferentes vectores PVX. 35S-PVX-CP: vector que proporciona la proteína de recubrimiento (CP) del PVX bajo el control del promotor 35S del CaMV; 35S-TVCV MP: vector que proporciona la proteína de movimiento (MP) del virus tobamovirus del aclaramiento de las nervaduras del nabo (TVCV) bajo el control del promotor 35S del CaMV. B - presentación esquemática de regiones de T-ADN de las construcciones pICH20799 y pICH21333. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; CP: proteína de recubrimiento del PVX. PVX ntr: región no traducida del PVX; GFP: proteína fluorescente verde (*Protein Fluorescent Green*) de medusa; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; RB: margen derecho (*Right Border*) de T-ADN; LB: margen izquierdo (*Left Border*) de T-ADN. Un ATG tachado significa que, para evitar el inicio de traducción en la posición indicada, se mutó un codón ATG.

25 Figura 2. Expresión de la GFP usando diferentes módulos del provector PVX. A - Hojas de *N. benthamiana* observadas con luz UV después de la agro infiltración con diferentes provectores PVX en dirección 5' en combinación con el provector pICH21282 en dirección 3' y en presencia de la integrasa C31 del fago que proporciona el ensamblaje, mediado por recombinación específica de sitio, del ADN que codifica el replicón viral. Solamente los provectores 5' (por ejemplo, pICH22922; pICH22942, etc.) marcan los puntos de inoculación. 35S-TVCV MP: proteína de movimiento (MP) del virus tobamovirus del aclaramiento de las nervaduras del nabo (TVCV) bajo el control del promotor 35S del CaMV. Las imágenes se tomaron 7 días después de la infiltración (7 dpi). Las suspensiones de *Agrobacterium* usadas para la infiltración se diluyeron 10^5 veces para lograr un nivel de expresión que permitiera la detección visual de las diferencias en los niveles de expresión. B representa las regiones de T-ADN de los plásmidos pIC22922, pICH22939, pICH22942, pICH22953 y pICH21282. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; 25K (truncamiento): gen truncado que codifica la proteína 25K; CP: proteína de recubrimiento del PVX; Pvx ntr: región no traducida del PVX; GFP: proteína fluorescente verde de medusa; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; int: extremo 5' del intrón de planta; AttP y AttB: secuencias reconocidas por la integrasa específica de sitio del fago C31.

40 Figura 3. Comparación de la expresión de la GFP usando módulos del provector del PVX que no proporcionan (pICH22922) o que proporcionan (pICH22939 ó pICH22988) para el movimiento de célula a célula en el tejido de planta. A - hoja de *N. benthamiana* observada con luz UV después de agro-infiltración con diferentes provectores de PVX en dirección 5' en combinación con el provector pICH21282 en dirección 3' y en presencia de la integrasa del fago C31 que proporciona el ensamblaje, mediado por recombinación específica de sitio, del ADN que codifica el replicón viral. La imagen se tomó 7 días después de la infiltración (7 dpi). Las suspensiones de *Agrobacterium* usadas para la infiltración se diluyeron 10^3 ó 10^5 veces como se ha indicado. B - representa las regiones de T-ADN de los plásmidos pIC22922, pICH22939 y pICH22988 pICH22953 y pICH21282. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; 25K (truncamiento): gen truncado que codifica la proteína 25K; TVCV MP: proteína de movimiento del virus tobamovirus del aclaramiento de las nervaduras del nabo; CP: proteína de recubrimiento del PVX; Pvx ntr: región no traducida del PVX; GFP: proteína fluorescente verde de medusa; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; int: extremo 5' del intrón de planta; AttP y AttB: secuencias reconocidas por la integrasa específica de sitio del fago C31.

55 Figura 4. Comparación de la expresión de la GFP usando módulos del provector del PVX que no proporciona (pICH22577) o que proporciona (pICH22988 ó pICH24180) para el movimiento de célula a célula. A - hoja de *N. benthamiana* observada con luz UV después de la agro-infiltración con diferentes provectores del PVX en dirección 5' en combinación con el provector pICH21282 en dirección 3' y en presencia de la integrasa del fago C31 que proporciona el ensamblaje, mediado por recombinación específica de sitio, del ADN que codifica el replicón viral. Las suspensiones de *Agrobacterium* usadas para la infiltración se diluyeron 10^3 ó 10^5 veces como se ha indicado. B - Representa las regiones de T-ADN de los plásmidos pIC22577, pICH22988 y pICH24180. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; CP: proteína de recubrimiento

del PVX; PVX ntr: región no traducida del PVX; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; sg25: promotor subgenómico del gen 25K; int: extremo 5' del intrón de planta; AttP: secuencia reconocida por la integrasa específica de sitio del fago C31.

5 Figura 5. Expresión de la GFP usando diferentes casetes de expresión del PVX (módulos de provector y vectores ensamblados) con la CP localizada en diferentes posiciones delante del gen de la GFP. A - Hoja de *N. benthamiana* observada con luz UV después de la agro-infiltración con los vectores virales ensamblados pICH25491, pICH25488 ó diferentes proectores del PVX en dirección 5' (pICH22988 ó pICH24180) en combinación con el provector pICH21282 en dirección 3' en combinación con el provector pICH21282 en dirección 3' y en presencia de la integrasa del fago C31 que proporciona el ensamblaje, mediado por recombinación específica de sitio, del ADN que codifica el replicón viral. La imagen se tomó 7 días después de la infiltración. La suspensión de *Agrobacterium* usada para la infiltración se diluyó 10⁵ veces. B - Representa las regiones de T-ADN de los plásmidos pIC22988, pICH25491, pICH25488 y pICH24180. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; CP: proteína de recubrimiento del PVX; Pvx ntr: región no traducida del PVX; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; sg25: promotor subgenómico del gen 25K; int: extremo 5' del intrón de planta; AttP: secuencia reconocida por la integrasa específica de sitio del fago C31.

Figura 6. Expresión de la GFP usando casetes de expresión del PVX ensamblados con la CP localizada en diferentes posiciones delante del gen de la GFP. A - Hoja de *N. benthamiana* observada con luz UV después de la agro-infiltración con los vectores virales pICH25491, pICH25488 y pICH20799 ensamblados, diez días (panel izquierdo) y dieciséis días (panel derecho) después de la infiltración. Las suspensiones de *Agrobacterium* usadas para la infiltración se diluyeron 10⁵ veces. B - Representa las regiones de T-ADN de los plásmidos pIC20799, pICH25491, y pICH25488. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; CP: proteína de recubrimiento del PVX; PVX ntr: región no traducida del PVX; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; sg25: promotor subgenómico del gen 25K.

Figura 7. Representa vectores de clonación del PVX con sitios de clonación (SC) múltiples. PVX Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN del virus X de la patata; 35S: promotor 35S del CaMV; 25K, 12K, 8K: bloque genético triple; CP: proteína de recubrimiento del PVX; PVX ntr: región no traducida del PVX; sgc: promotor subgenómico del gen de la proteína de recubrimiento; sg25: promotor subgenómico del gen 25K.

Figura 8. Muestra un mapa de pICH25491. En la SEC ID NO: 6 se proporciona la secuencia nucleotídica de la región del T-ADN de pICH25491.

Figura 9. Muestra un mapa de pICH25488. En la SEC ID NO:5, se proporciona la secuencia nucleotídica de la región del T-ADN de pICH25488.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un nuevo diseño para los replicones de ARN derivados de potexvirus que mejora la producción de una proteína de interés que va a expresarse a partir de dichos replicones de ARN en una planta o en un tejido de planta. El procedimiento de la invención tiene mejores características de bioseguridad que los replicones de ARN derivados de potexvirus convencionales, ya que produce menos proteína de recubrimiento viral, y en consecuencia puede formar menos partículas virales.

Sorprendentemente, los autores de la invención descubrieron que la posición de una secuencia codificante de una proteína de recubrimiento o proteína de movimiento heteróloga que precede a dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo (iii) que codifica una proteína de interés, aumenta la producción de dicha proteína recombinante a expensas de la proteína de recubrimiento viral. La proteína de recubrimiento del PVX es necesaria no solamente para el movimiento sistémico, sino también, junto con otras tres proteínas del bloque genético triple, para el movimiento de célula a célula (de distancia corta) (Yang et al., 2000, Mol. Plant Microbe Interact, 13:599-605; Fedorkin et al., 2001, J. Gen. Virol., 82:449-458). En el presente documento, se muestra (véase el Ejemplo 1 y la Figura 1) que la ausencia de la proteína de recubrimiento del PVX hace a los replicones de ARN derivados del PVX deficientes en cuanto al movimiento de distancia larga (Figura 1A, panel izquierdo) y en cuanto al movimiento de célula a célula (Figura 1A, panel derecho). El movimiento de célula a célula puede restablecerse proporcionando la proteína de recubrimiento (CP) del PVX *in trans* o una proteína de movimiento tobamoviral, por ejemplo, la proteína de movimiento (MP) del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Figura 1A, panel derecho). También se muestra (Ejemplo 2, Figura 2) que el replicón de ARN derivado del PVX con una proteína de movimiento del TVCV es capaz de movimiento de distancia corta (de célula a célula). El experimento se realizó usando el sistema del provector (Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:6852-6857) que permite el ensamblaje en la planta de un precursor de ADN de un replicón de ARN mediante recombinación específica de sitio, por ejemplo, entre los sitios AttP y AttB de los proectores (Figura 2B).

Un análisis comparativo de replicones de ARN derivados del PVX, con cualquier MP del TVCV (pICH22939) o CP del PVX, se describe en el Ejemplo 3 y se muestra en la Figura 3. Como en el caso descrito anteriormente, se usó el sistema de provector. A partir de la Figura 3 es evidente que la CP del PVX posicionada delante del gen de interés proporciona un movimiento de célula a célula de dicho replicón de ARN. Como se desprende del brillo y la densidad de las manchas de la GFP (Figura 3A), la eficacia del movimiento de célula a célula es significativamente más alta que con la MP del TVCV.

En otra realización de esta invención, se ensayó el efecto de la posición de la CP del PVX que precede al gen de interés. A partir de la Figura 4A es evidente que la ubicación de la CP después del bloque genético triple proporciona un movimiento de célula a célula más eficaz que la ubicación de dicha CP entre la ARN polimerasa dependiente de ARN del PVX y el bloque genético triple. En este experimento también se usó el sistema provector. No se encontró diferencia en el nivel de expresión de la proteína de interés (GFP) entre los casos en los que se usaron vectores o vectores ensamblados que proporcionaron los replicones de ARN derivados del PVX (véase el Ejemplo 5, Figura 5). Cuando en los estudios comparativos se incluían vectores que proporcionaban el replicón de ARN que contenía la CP después del gen de interés, el nivel de expresión (brillo del área de expresión de GFP) de dicho gen de interés de dicho vector era, sorprendentemente, significativamente más débil comparado con los vectores en los que la CP se posicionaba antes del gen de interés (pICH20799 frente a pICH25488 ó pICH25491, Figura 6, Ejemplo 6).

En los ejemplos, se usan replicones de ARN basados en PVX. Sin embargo, para la construcción de vectores basados en virus de ARN de acuerdo con la presente invención pueden usarse otros virus pertenecientes al grupo taxonómico de potexvirus. Las especies virales que pueden utilizarse para la invención incluyen, pero sin limitación, potexvirus del mosaico del bambú, potexvirus del mosaico de la papaya, potexvirus del mosaico de la *Alternanthera*, virus del mosaico amarillo del trébol, virus X del plátano, virus del mosaico blanco del trébol, y virus del mosaico Aucuba de la patata. Para detalles acerca de las proteínas de movimiento viral en plantas, véase la revisión reciente de WJ Lucas (2006, *Virology*, 344:169-184).

En el procedimiento de la invención puede usarse un replicón de ARN derivado de un virus de planta, por ejemplo, a partir del virus X de la patata (PVX). Sin embargo, pueden usarse dos o más replicones de ARN diferentes en una planta o un tejido de planta, para expresar dos proteínas de interés diferentes, donde dichos replicones de ARN diferentes derivan preferiblemente de virus de planta diferentes. Dichos virus de planta diferentes, de los que pueden derivar dichos replicones de ARN diferentes, son preferiblemente virus sinérgicos o no competidores. En el presente documento, los términos "sinérgico" y "no competidor", se usan como sinónimos. Los virus sinérgicos pueden coexistir y amplificarse de manera eficaz en las mismas células de planta. De modo similar, los replicones de ARN derivados de virus de ARN sinérgicos pueden coexistir y amplificarse de manera eficaz en las mismas células de planta. Un ejemplo de un par de replicones de ARN sinérgicos es un par de replicones de ARN, en el que un replicón de ARN deriva del TMV o del TVCV y el otro replicón de ARN deriva de un potexvirus tal como el PVX. Los replicones de ARN sinérgicos pueden usarse para la expresión de dos o más proteínas o subunidades de proteína de interés, tales como la cadena pesada y la ligera de un anticuerpo monoclonal, en la misma célula de planta. En el documento EP1686176 se describen procesos de expresión de dos o más proteínas de interés en la misma planta o en las mismas células de planta, usando diferentes vectores virales (no competidores).

En los ejemplos, se usó predominantemente la administración de vectores virales, mediada por *Agrobacterium*, en células de plantas. Para la administración de vectores en células de planta pueden usarse otros métodos diversos usados normalmente para la transformación estable de plantas, tales como la introducción directa de una secuencia nucleotídica heteróloga en las células por medio de bombardeo con microproyectiles, electroporación o transformación de protoplastos mediada por PEG. Se prefiere la transformación de la planta mediada por *Agrobacterium*. Por lo tanto, una secuencia nucleotídica heteróloga puede transformarse en el interior de células de planta mediante varias tecnologías tales como por un vector del plásmido Ti transportado por *Agrobacterium* (documentos US 5,591,616; US 4,940,838; US 5,464,763), por bombardeo de partículas o microproyectiles (documentos US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). En principio, también pueden usarse otros métodos de transformación de plantas, por ejemplo, microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), electroporación (documentos EP00564595B1; EP00290395B1; WO 08706614A1), etc. La selección del método de transformación depende, entre otras cosas, de la especie de planta que se va transformarse. Por ejemplo, el bombardeo de microproyectiles puede preferirse para la transformación de monocotiledóneas, mientras que para las dicotiledóneas generalmente da mejores resultados la transformación mediada por *Agrobacterium*.

La presente invención se realiza preferiblemente con plantas superiores, multicelulares. Las plantas preferidas para el uso en esta invención incluyen cualquier especie de planta, dando preferencia a especies importantes desde el punto de vista agronómico y hortícola. Las plantas de cultivo comunes para el uso en la presente invención incluyen plantas de alfalfa, cebada, frijoles, colza, guisante pinto, algodón, maíz, trébol, loto, lentejas, altramuz, mijo, avena, guisantes, cacahuete, arroz, centeno, trébol de olor, girasol, guisante de olor, soja, triticale de sorgo, frijoles de camote, frijol

terciopelo, algarroba, trigo, glicina y nuez. Las especies de plantas preferidas para llevar a la práctica esta invención incluyen, pero sin restricción:

5 Representantes de Gramíneas, Compuestas, Solanáceas y Rosáceas. Adicionalmente, las especies preferidas de plantas para usarse en la invención, así como las especificadas anteriormente, son las 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*, *Nemesia*, *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*, *Olyreae*, *Pharoideae* y muchas otras.

15 En una realización específica del procedimiento de la invención, los replicones de ARN derivados del PVX se usan con plantas de *Nicotiana*.

Las proteínas de interés, o fragmentos de las mismas, que pueden expresarse en orientación en sentido o antisentido, usando la invención, incluyen: enzimas modificadoras de almidón (almidón sintasa, enzima de fosforilación de almidón, enzima desramificante, enzima de ramificación de almidón, enzima II de ramificación de almidón, almidón sintasa unida a gránulos), sacarosa fosfato sintasa, sacarosa fosforilasa, poligalacturonasa, polifructano sucraza, ADP glucosa fosforilasa, ciclodextrin glucosil transferasa, fructosil transferasa, glucógeno sintasa, pectin esterasa, aprotinina, avidina, levansucraza bacteriana, proteína glgA de *E. coli*, MAPK4 y ortólogos, enzima de asimilación/metabolismo de nitrógeno, glutamina sintasa, osmotina de planta, albúmina 2S, taumatina, recombinasa/integrasa específica de sitio (FLP, Cre, recombinasa R, Int, integrasa R de SSVI, phiC31 integrasa, o un fragmento activo o variante de las mismas), isopentenil transferasa, Sca M5 (calmodulina de semilla de soja), toxina de tipo coleóptero o un fragmento activo desde el punto de vista insecticida, proteínas de fusión de la enzima de conjugación de ubiquitina (E2), enzimas que metabolizan lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y polisacáridos, súper óxido dismutasa, la forma de proenzima inactiva de una proteasa, toxinas de proteínas de planta, rasgos que modifican la fibra en plantas productoras de fibra, toxina de *Bacillus thuringiensis* activa contra coleópteros(toxina B72, proteína cristalina insecticida (ICP), toxina CryIC, endotoxina delta, toxina polipeptídica, protoxina, etc.), toxina AaIT específica de insecto, enzimas degradantes de celulosa, celulasa E1 de *Acidothermus celluloticus*, enzimas modificadoras de lignina, cinnamoil alcohol dehidrogenasa, trehalosa-6-fosfato sintasa, enzimas de la ruta metabólica de citoquinina, HMG-CoA reductasa, pirofosfatasa inorgánica de *E. Coli*, proteína de almacenamiento de semilla, licopeno sintasa de *Erwinia herbicola*, ACC oxidasa, proteína pTOM36 codificada, fitasa, cetohidrolasa, acetoacetil CoA reductasa, PHB (polihidroxibutanoato) sintasa, proteína transportadora de acilos, napina, EA9, fitoeno sintasa de plantas no superiores, proteína pTOM5 codificada, ETR (receptor de etileno), piruvato fosfato diquinasa plástica, proteína de poro transmembrana inducible por nematodos, rasgos que mejoran la función fotosintética o plastidial de la célula 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 del CMV, proteína de recubrimiento del TMV, replicasa de luteovirus, ARN mensajero de MDMV, replicasa geminiviral mutante, acil- ACP tioesterasa que prefiere C12:0 de *Umbellularia californica*, acil- ACP tioesterasa que prefiere C10 ó C12:0 de planta, acil- ACP tioesterasa que prefiere C:14:0 (luxD), factor A de sintasa de planta, factor B de sintasa de planta, 6-desaturasa, proteína que tenga una actividad enzimática en la oxidación peroxisomal de los ácidos grasos en células de plantas, acil-CoA oxidasa, 3-cetoacil-CoA tiolasa, lipasa, acetil-CoA carboxilasa del maíz, 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP), fosfinotricin acetiltransferasa (BAR, PAT), proteína CP4, ACC desaminasa, ribozima, proteína que tenga sitio de escisión post-traducciona, fusión de proteína que consiste en un dominio de unión a ADN del activador transcripcional Gal4 y un dominio de activación transcripcional, una fusión traducciona de la proteína oleosina con la proteína de interés capaz de dirigir la proteína de fusión a la fase lipídica, gen 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 hidrófoba amino terminal de una proteína madura translocadora de fosfato que reside en la membrana de la envoltura interna del plástido con la proteína de interés que va a dirigirse al interior de dicha membrana, etc.

55 Usando el sistema de la invención, puede expresarse cualquier proteína humana o animal. Los ejemplos de dichas proteínas de interés incluyen, entre otros, las siguientes proteínas (proteínas farmacéuticas): proteínas de respuesta inmune (anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, receptores de células T, etc.), antígenos, factores estimulantes de colonias, relaxinas, hormonas polipeptídicas, citocinas y sus receptores, interferones, factores de crecimiento y factores de coagulación, enzima lisosomal enzimáticamente activa, polipéptidos fibrinolíticos, factores de coagulación sanguínea, tripsinógeno, 1-antitripsina (AAT), así como proteínas conservadoras de la función, como fusiones, versiones mutantes y derivados sintéticos de las proteínas mencionadas anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Las construcciones del PVX que carecen de CP no se mueven de célula a célula

Se obtuvo una construcción del PVX que contenía un gen de la GFP (pA3151), del Profesor Yuri Dorokhov (Universidad Estatal de Moscú, Rusia). Esta construcción se realizó clonando un fragmento de NheI-SalI que contenía la secuencia codificante de la GFP en pPVX201 (Baulcombe, D., Chapman, S. & Santa Cruz, S., 1995, Plant J., 7:1045-1053) digerida con NheI y SalI, y después subclonando a partir de la construcción resultante un fragmento Hind3-SacI (que contenía el inserto viral entero y el gen de la GFP) en el pBIN19. Después, el inserto viral se subclonó a partir de pA3151 en pICBV52 (un pequeño vector binario Kan^R basado en pBIN19) como un fragmento SacI-SphI, dando como resultado el plásmido pICH20799. Esta construcción contiene la construcción del PVX clonada bajo el control del promotor 35S (Figura 1B). La secuencia codificante de la GFP se expresa a partir de un promotor subgenómico de la CP (sgc) duplicado, y se localiza entre el bloque genético triple (TGB) y la secuencia codificante de la CP. Dado que el fragmento del promotor subgenómico duplicado cadena arriba de la GFP también contenía el codón de inicio de la CP, el codón de inicio se eliminó por mutación de ATG a AGG.

A partir de pICH20799 se realizó una construcción de control que carecía de la CP (Figura 1B), suprimiendo el gen de la CP y su promotor subgenómico (usando PCR solapando uno de los cebadores los puntos de supresión terminales). La construcción resultante, pICH21333 (Figura 1B), se transformó en *Agrobacterium* y se infiltró en una hoja de *Nicotiana benthamiana*. Como se esperaba, los replicones virales no pudieron moverse de célula a célula o sistémicamente. El movimiento de los replicones se recuperó cuando pICH21333 se infiltró conjuntamente con las construcciones pICH10745 ó pICH22066, que proporcionan expresión transitoria de la MP del TVCV o de la CP del PVX, respectivamente (Figura 1A). Las construcciones pICH10745 y pICH22066 contienen, bajo el control del promotor 35S, las secuencias codificantes de la MP del TVCV o las de la CP del PVX, respectivamente.

Ejemplo 2

30 Un replicón de PVX con el gen de MP del TVCV clonado entre el TGB y el gen de interés puede moverse de célula a célula

Dado que la MP del TVCV puede proporcionar movimiento de célula a célula a los replicones del PVX que carecen de la CP del PVX, el gen de la MP del TVCV se clonó en la construcción del PVX entre el bloque genético triple y el gen de interés (en este caso, la GFP), bajo el control de un promotor subgenómico de la CP duplicado. Por razones prácticas, esta construcción (pICH22939, Figura 2B y SEC ID NO:1) se realizó como un módulo provector en dirección 5' que contenía el promotor 35S fusionado con las secuencias del vector viral en dirección 5' pero que carecía de la parte 3' de la construcción incluyendo la secuencia codificante del gen de interés y la NTR (región no traducida) 3' del PVX. Un sitio de recombinación (el sitio AttP del fago C31 de *Streptomyces*) y las secuencias intrónicas siguen a las secuencias de la construcción viral. Un módulo de provector en dirección 3' (pICH21282, Figura 2B), contiene un sitio de recombinación compatible (sitio de recombinación AttB del fago C31 de *Streptomyces*) seguido por las secuencias intrónicas, el gen de la GFP y la NTR del PVX. Las partes 5' y 3' de la construcción se ensamblan *in vivo* por recombinación específica de sitio en los sitios de recombinación por infiltración conjunta de la agrobacteria que contiene los módulos 5' y 3' y la recombinasa PhiC31 (pICH10881, que contiene la recombinasa PhiC31 bajo el control del promotor ACT2 de *Arabidopsis*, véase Marillonnet et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 6852-6857). Después de la administración del T-ADN de los módulos 5' y 3' a las células de planta y de la recombinación en los sitios AttP y AttB, el ADN recombinado se transcribe a partir del promotor 35S. El sitio de recombinación se escinde del transcrito por corte y empalme de las secuencias intrónicas flanqueantes, y el transcrito cortado y empalmado se exporta desde el núcleo hacia el citoplasma donde se amplifica como un replicón de ARN viral normal.

50 La infiltración de una construcción de provector de control (provector 5' pICH22922 sin secuencias de MP del TVCV) con el provector 3' pICH21282, condujo a la formación de replicones incapaces de movimiento de célula a célula. En cambio, la infiltración del pICH22939 condujo a replicones que podían moverse de célula a célula (Figura 2A).

55 Dado que el TMV puede proporcionar movimiento de célula a célula a los replicones del TMV sin necesidad de otras proteínas virales, se realizó una segunda construcción del PVX en la cual se suprimieron las proteínas 12K y 8K del bloque genético triple, dando como resultado la construcción pICH22953 (Figura 2B y SEC ID NO:2). En este caso, la MP del TMV se expresa desde el promotor subgenómico de 12K (sg12). La infiltración de pICH22953 con pICH21282 condujo a replicones que podían moverse de célula a célula. Sin embargo, el movimiento de célula a célula y la fluorescencia de la GFP no fueron mejores o más fuertes que cuando se usó la construcción pICH22939 (Figura 2).

60

Ejemplo 3

Un vector del PVX con un gen de CP del PVX clonado entre el TGB y el gen de interés, puede moverse de célula a célula.

5

Se realizó una construcción similar a pICH22939, pero con la CP del PVX reemplazando a la MP del TVCV. La secuencia de esta construcción es la misma que la del virus tipo silvestre desde el extremo 5' del virus hasta el extremo de la CP. Después, la CP es seguida por el promotor subgenómico de CP duplicado que se usa para la expresión del gen de interés. La infiltración de esta construcción, pICH22988 (Figura 3B), con pICH21282 (Figura 2B) condujo a la formación de replicones que se movían de célula a célula mucho más rápido y que producían fluorescencia de la GFP más brillante que la de los replicones producidos a partir de pICH22939 (Figura 3A).

10

Ejemplo 4

Un vector del PVX con un gen de la CP del PVX clonado entre la RdRP y el TGB puede moverse de célula a célula

15

El gen de la CP del PVX se clonó entre la RdRp y el bloque genético triple, bajo el control de un promotor subgenómico de 25K duplicado (sg25), dando como resultado la construcción pICH24180 (Figura 4B, SEC ID NO:3). La infiltración de pICH24180 en combinación con pICH21282 y una fuente de integrasa (pICH10881), condujo a la formación de replicones virales que podían moverse de célula a célula (Figura 4A). La construcción pICH22577 (similar a pICH22922 pero diferente para unos cuantos sitios de restricción) se infiltró en vez de pICH24180 en el experimento de control y, como se esperaba, no mostró movimiento de célula a célula. Como con pICH22988, la fluorescencia de la GFP a partir de pICH24180 fue más fuerte que con la construcción pICH22939.

20

Ejemplo 5

Los vectores virales del PVX ensamblados completos que contienen CP también proporcionan movimiento de célula a célula

25

Se realizaron las construcciones ensambladas que incluían un provector 3' con parte de GFP (pICH21282, Figura 2B) y correspondientes a los vectores pICH22988 ó pICH24180, produciendo respectivamente los plásmidos pICH25488 y pICH25491 (Figura 5B). Las secuencias nucleotídicas de la región de T-ADN de pICH25488 y pICH25491 se proporcionan como SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 6, respectivamente. Se encontró que, como se esperaba, ambas construcciones actuaban como los vectores y que proporcionaban movimiento de célula a célula y fuerte fluorescencia de la GFP (Figura 5A). La fluorescencia de la GFP también fue mucho más fuerte que con la construcción patrón (pICH20799) en la cual el gen de CP se localiza después del gen de interés lo que sugiere la expresión de más proteína recombinante (Figura 6A). Los geles de proteína teñidos con Coomassie mostraron que se expresaba una cantidad mucho mayor de proteína GFP a partir de pICH25491 y pICH25488 que de pICH20799, y que, en cambio, se produjo una cantidad mucho mayor de CP del PVX a partir de pICH20799 que de las otras dos construcciones.

30

35

40

Ejemplo 6

Vectores de clonación del PVX

Se muestra una representación esquemática de dos tipos de vectores de clonación del PVX con la CP entre la RdRP y el TGB, o entre el TGB y el gen de interés. CS: sitios de clonación.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Icon Genetics GmbH
- 5 <120>Replicón derivado de Potexvirus
- <130> PCT-14592
- <150> EP 06 018 713.5
- 10 <151> 6-9-2006
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.1
- 15 <210> 1
- <211> 786
- <212>ADN
- <213>Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223>Fragmento de pICH22939 (entre el promotor subgenómico de la MP del TMV de 25 K y el promotor subgenómico del gen de interés)
- 25 <400> 1
- | | |
|---|------------|
| tactcgaag aggtcagcac cagctagaaa atgtcgatag tctcgtacga acctaaggtg | 60 |
| agtgatttcc tcaatctttc gaagaaggaa gagatcttgc cgaaggctct aacgaggtta | 120 |
| aaaaccgtgt ctattagtac taaagatatt atatctgtca aggagtcgga gactttgtgt | 180 |
| gatatagatt tgtaatacaa tgtgccatta gataegtata gatatgtggg taccctagga | 240 |
| gctgttttta ccggagagtg gctagtgcc aacttcgta aagggtggagt gacgataagt | 300 |
| gtgatagata agcgtctggt gaactcaaag gagtgcgtga ttggtacgta cagagccgca | 360 |
| gccaaagagta agaggttcca gttcaaattg gttccaaatt actttgtgtc caccgtggac | 420 |
| gcaaagagga agccgtggca ggttcatggt cgtatacaag acttgaagat tgaggcgggt | 480 |
| tgccagccgt tagctctgga agtagtttca gttgctatgg tcaccaataa cgttgtcatg | 540 |
| aagggtttga gggaaaaggt cgtcgcaata aatgatccgg acgtcgaagg tttcgaaggt | 600 |
| gtggttgacg aattcgtcga ttcggttgca gcatttaaag cggttgacaa tttcaggaag | 660 |
| aggaaaaaga aggttgaaga aagggatgta gtaagtaagt ataaatatag accggagaaa | 720 |
| tacgccggtc ctgattcgtt taatttaaaa gaagaaaatg tcttacaaca ttacaaacct | 780 |
| gaataa | 786 |
- <210> 2
- <211> 792
- 30 <212>ADN
- <213>Secuencia Artificial
- <220>
- <223>Fragmento de la secuencia de pICH22953 que contiene los 11 aminoácidos C-terminal de la secuencia codificante de 25K, seguido por la secuencia codificante de la MP del TVCV (en la secuencia de 25 K, el codón ATG de la proteína
- 35

ES 2 389 783 T3

de 12K se mutó de ATG a ACG)

<400> 2

```

caaagggatt gacatacgtc cgcgcagggc catagaaaaa tgtcgatagt ctcgtacgaa      60
cctaaggtga gtgatttcct caatctttcg aagaaggaag agatcttgcc gaaggctcta      120
acgaggttaa aaaccgtgtc tattagtact aaagatatta tatctgtcaa ggagtcggag      180
actttgtgtg atatagattt gttaatcaat gtgccattag ataagtatag atatgtgggt      240
atcctaggag ctgtttttac cggagagtgg ctagtgccag acttcgtaa aggtggagtg      300
acgataagtg tgatagataa gcgtctggtg aactcaaagg agtgcgtgat tggtagctac      360
agagccgcag ccaagagtaa gaggttccag ttcaaattgg ttccaaatta ctttgtgtcc      420
accgtggacg caaagaggaa gccgtggcag gttcatgttc gtatacaaga cttgaagatt      480
gaggcggggtt ggcagccggt agctctggaa gtagtttcag ttgctatggt caccaataac      540
gttgtcatga agggtttgag ggaaaaggtc gtcgcaataa atgatccgga cgtcgaaggt      600
ttcgaaggtg tggttgacga attcgtcgat tcggttgcag catttaaagc ggttgacaat      660
ttcaggaaga ggaaaaagaa ggttgaagaa agggatgtag taagtaagta taaatataga      720
ccggagaaat acgccggtcc tgattcgttt aatttaaag aagaaaatgt cttacaacat      780
tacaaacccg aa                                                                792

```

- 5 <210> 3
- <211> 817
- <212>ADN
- <213>Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223>Fragmento de la secuencia de pICH24180 que incluye los 4 últimos aminoácidos de la RdRP, el promotor subgenómico del gen de25K, el gen de la CP del PVX, el promotor subgenómico del gen de 25K y los 4 primeros aa de la proteína de 25K.

- 15 <400> 3

ES 2 389 783 T3

agaaactttc ttttaaccggt aagttacctt agagatttga ataagatgtc agcaccagct 60
agcacaacac agcccatagg gtcaactacc tcaactacca caaaaactgc aggcgcaact 120
cctgccacag cttcaggcct gttcactatc ccggatgggg atttcttttag tacagcccgt 180
gccatagtag ccagcaatgc tgtcgcaaca aatgaggacc tcagcaagat tgaggctatt 240
tggaaggaca tgaaggtgcc cacagacact atggcacagg ctgcttggga cttagtca 300
cactgtgctg atgtaggatc atccgctcaa acagaaatga tagatacagg tccttattcc 360
aacggcatca gcagagctag actggcagca gcaattaaag aggtgtgcac acttaggcaa 420
ttttgcatga agtatgcccc agtggtatgg aactggatgt taactaaca cagtccacct 480
gctaactggc aagcacaagg tttcaagcct gagcacaat tcgctgcatt cgacttcttc 540
aatggagtca ccaaccagc tgccatcatg cccaagagg ggctcatccg gccaccgtct 600
gaagctgaaa tgaatgctgc ccaaactgct gcctttgtga agattacaaa ggccagggca 660

caatccaacg actttgccag cctagatgca gctgtcactc gaggtcgtat cactggaaca 720
acaaccgctg aggtgtttgt cactctacca ccaccataac agaaactttc ttttaaccggt 780
aagttacctt agagatttga ataagatgga tattctc 817

<210> 4

<211> 4371

5 <212>ADN

<213>Secuencia Artificial

<220>

10 <223>Fragmento de la secuencia de pICH25488 que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN

<400> 4

atggccaagg tgcgcgaggt ttaccaatct tttacagact ccaccacaaa aactctcatc 60
 caagatgagg cttatagaaa cattcgcccc atcatggaaa aacacaaact agctaaccct 120
 tacgctcaaa cggttgaagc ggctaatgat ctagaggggt tcggcatagc caccaatccc 180
 tatagcattg aattgcatac acatgcagcc gctaagacca tagagaataa acttctagag 240
 gtgcttggtt ccacctacc acaagaacct gttacattta tgtttcttaa acccagaaag 300
 ctaaaactaca tgagaagaaa cccgcggatc aaggacattt tccaaaatgt tgccattgaa 360
 ccaagagacg tagccaggta cccaaggaa acaataattg acaaactcac agagatcaca 420
 acggaacag catacattag tgacactctg cacttcttgg atccgagcta catagtggag 480
 acattccaaa actgccc aaa attgcaaca ttgtatgca ccttagttct cccogttgag 540
 gcagccttta aatggaaag cactcaccgc aacatataca gcctcaaata cttcggagat 600
 ggtttccagt atataccagg caaccatggt ggcggggcat accatcatga attcgctcat 660
 ctacaatggc tcaaagtggg aaagatcaag tggagggacc ccaaggatag ctttctcggg 720
 catctcaatt acacgactga gcaggttgag atgcacacag tgacagtaca gttgcaggaa 780
 tcgttcgagg caaaccactt gtactgcate aggagaggag acttgctcac accggaggtg 840
 cgcactttcg gccaacctga caggtacgtg attccaccac agatcttctt cccaaaagt 900
 cacaactgca agaagccgat tctcaagaaa actatgatgc agctcttctt gtatgtagg 960
 acagtcaagg tcgcaaaaaa ttgtgacatt tttgccaag tcagacaatt aattaaatca 1020
 tctgacttgg acaaatactc tgctgtggaa ctggtttact tagtaagcta catggagttc 1080
 cttgcccatt tacaagctac cacctgcttc tcagacacac tttctgggtg cttgctaaca 1140
 aagacccttg caccggtgag ggcttgata caagagaaaa agatgcagct gtttggctct 1200
 gaggactacg cgaagttagt caaagcagtt gatttccacc cggtggtatt ttctttcaaa 1260
 gtggaaactt gggacttcag attccacccc ttgcaagcgt ggaaagcctt ccgaccaagg 1320
 gaagtgtcgg atgtagagga aatggaaagt ttgttctcag atggggacct gcttgattgc 1380

ttcacaagaa tgccagctta tgcggtaaac gcagaggaag atttagctgc aatcaggaaa 1440
 acgcccgaga tggatgtcgg tcaagaagtt aaagagcctg caggagacag aatcaatac 1500
 tcaaaccctg cagaaacttt cctcaacaag ctccacagga aacacagtag ggaggtgaaa 1560
 caccaggccg caaagaaagc taaacgccta gctgaaatcc aggagtcaat gagagctgaa 1620
 ggtgatgccg aaccaaatga aataagcggg acgatggggg caatacccag caacgccgaa 1680
 ctctctggca cgaatgatgc cagacaagaa ctcacactcc caaccactaa acctgtccct 1740
 gcaaggtggg aegatgcttc attcacagat tctagtgtgg aagaggagca ggttaaactc 1800
 cttggaaaag aaaccgttga aacagcgacg caacaagtca tcgaaggact tccttgaaa 1860
 cactggattc ctcaatataa tgetgttggg ttcaaggcgc tggaaattca gagggatagg 1920
 agtggaaaca tgatcatgcc catcacagaa atggtgtccg ggctggaaaa agaggacttc 1980
 cctgaaggaa ctccaaaaga gttggcacga gaattgttcg ctatgaacag aagccctgcc 2040
 accatccctt tggacctgct tagagccaga gactacggca gtgatgtaaa gaacaagaga 2100
 attggtgcca tcacaaagac acaggcaacg agttggggcg aatacttgac aggaaagata 2160
 gaaagcttaa ctgagaggaa agttgcgact tgtgtcattc atggagctgg aggttctgga 2220
 aaaagtcatg ccatccagaa ggcattgaga gaaattggca agggctcggg catcactgta 2280
 gtctgcoga ccaatgaact ggggctagat tggagtaaga aagtgcctaa cactgagccc 2340
 tatatgttca agacctctga aaaggcgta attgggggaa caggcagcat agtcatcttt 2400
 gacgattact caaaacttcc tcccggttac atagaagcct tagtctgttt ctactctaaa 2460
 atcaagctaa tcattctaac aggagatagc agacaaagcg tctaccatga aactgctgag 2520
 gacgcctcca tcaggcattt gggaccagca acagagtact tctcaaaata ctgccgatac 2580
 tatctcaatg ccacacaccg caacaagaaa gatcttgca acatgcttg tgtctacagt 2640
 gagagaacgg gagtaccga aatcagcatg agcgccgagt tcttagaagg aatcccaact 2700
 ttggtaccct cggatgagaa gagaaagctg tacatgggca ccgggaggaa tgacacgttc 2760
 acatagctg gatgccaggg gctaactaag ccgaaggtac aaatagtgtt ggaccacaac 2820
 acccaagtgt gtagecggaa tgtgatgtac acggcacttt ctagagccac cgataggatt 2880
 cacttcgtga acacaagtgc aaattcctct gccttctggg aaaagttgga cagcaccctt 2940
 tacctcaaga ctttctatc agtggtgaga gaacaagcac tcagggagta cgagccggca 3000
 gaggcagagc caattcaaga gcctgagccc cagacacaca tgtgtgtcga gaatgaggag 3060
 tccgtgctag aagagtacaa agaggaactc ttggaaaagt ttgacagaga gatccactct 3120
 gaatcccatg gtcattcaaa ctgtgtccaa actgaagaca caaccattca gttgtttctg 3180
 catcaacaag caaagatga gactctctc tgggcgacta tagatgcgcg gctcaagacc 3240
 agcaatcaag aaacaaactt ccgagaattc ctgagcaaga aggacattgg ggacgttctg 3300

```

tttttaaact accaaaaage tatgggttta cccaaagage gtattccttt ttccaagag 3360
gtctgggaag cttgtgcca cgaagtaca agcaagtacc tcagcaagtc aaagtgaac 3420
ttgatcaatg ggactgtgag acagagccca gacttcgatg aaaataagat tatggtattc 3480
ctcaagtcgc agtgggtcac aaaggtggaa aaactaggtc tacccaagat taagccaggt 3540
caaaccatag cagcctttta ccagcagact gtgatgcttt ttggaactat ggctaggtac 3600
atgcgatggt tcagacaggc tttccagcca aaagaagtct tcataaactg tgagacgacg 3660
ccagatgaca tgtctgcatg ggccttgaac aactggaatt tcagcagacc tagcttgget 3720
aatgactaca cagctttcga ccagtctcag gatggagcca tgttgcaatt tgaggtgctc 3780
aaagccaaac accactgcat accagaggaa atcattcagg catacataga tattaagact 3840
aatgcacaga ttttcctagg cacgttatca attatgcgcc tgactggtga aggtcccact 3900
tttgatgcaa aactgagtg caacatagct tacaccata caaagtttga catcccagcc 3960
ggaactgctc aagtttatgc aggagacgac tccgcactgg actgtgttcc agaagtgaag 4020
catagtttcc acaggcttga ggacaaatta ctctaaagt caaagcctgt aatcacgcag 4080
caaaagaagg gcagttggcc tgagttttgt ggttggctga tcacaccaa aggggtgatg 4140
aaagaccaa ttaagctcca tgtagctta aaattggctg aagctaaggg tgaactcaag 4200
aaatgtcaag attcctatga aattgatctg agttatgcct atgaccaca ggactctctg 4260
catgacttgt tcgatgagaa acagtgtcag gcacacacac tcacttgag aacactaatc 4320
aagtcagga gaggcactgt ctcacttcc cgctcagaa actttcttta a 4371

```

<210> 5
 <211> 8070
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

5

<220>
 <223>Región de T-ADN del plásmido pICH25488

10

<400> 5

ES 2 389 783 T3

cctgatctgg ggaaccctgt ggttggcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca 60
cgccctttta aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcca 120
atatatcctg tcaaacactg atagttaaa ctgaaggcgg gaaacgaaa tctgatctaa 180
gctaggcatg cctgcaggtc aacatggtgg agcacgacac gcttgtctac tccaaaaata 240
tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac ttttcaaaa agggtaatat 300
ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg 360
aaaaggaagg tggctcctac aatgccatc attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag 420
atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 480
aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg 540

taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacce ttcctctata taaggaagtt 600
 catttcattt ggagaggaga aaactaaacc atacaccacc aacacaacca aaccaccac 660
 gcccaattgt tacacaccgg cttgaaaaag aaagttaac aaatggccaa ggtgcgcgag 720
 gtttaccaat cttttacaga ctccaccaca aaaactctca tccaagatga ggcttataga 780
 aacattcgcc ccatcatgga aaaacacaaa cttagtaacc cttacgctca aacggttgaa 840
 gcggtaatg atctagaggg gttcggcata gccaccaatc cctatagcat tgaattgcat 900
 acacatgcag ccgctaagac catagagaat aaacttctag aggtgcttgg ttccatccta 960
 ccacaagaac ctgttacatt tatgtttctt aaaccagaa agctaaacta catgagaaga 1020
 aacccgcgga tcaaggacat ttccaaaat gttgccattg aaccaagaga cgtagccagg 1080
 taccceaagg aaacaataat tgacaaactc acagagatca caacggaaac agcatacatt 1140
 agtgacactc tgcacttctt ggatccgagc tacatagtgg agacattcca aaactgcca 1200
 aaattgcaa cattgtatgc gaccttagtt ctcccogttg aggcagcctt taaaatggaa 1260
 agcactcacc cgaacatata cagcctcaaa tacttcggag atggtttcca gtatatacca 1320
 ggcaaccatg gtgggggggc ataccatcat gaattcgctc atctacaatg gctcaaagtg 1380
 ggaaagatca agtggaggga cccaaggat agctttctcg gacatctcaa ttacacgact 1440
 gagcaggttg agatgcacac agtgacagta cagttgcagg aatcgttcgc ggcaaaccac 1500
 ttgtactgca tcaggagagg agacttgctc acaccggagg tgcgcacttt cggccaacct 1560
 gacaggtacg tgattccacc acagatcttc ctccaaaag ttcacaactg caagaagccg 1620
 attctcaaga aaactatgat gcagctcttc ttgtatgta ggacagtcaa ggtcgcaaaa 1680
 aattgtgaca tttttgcaa agtcagacaa ttaattaaat catctgactt ggacaaatac 1740
 tctgctgtgg aactggttta cttagtaagc tacatggagt tecttgccga tttacaagct 1800
 accacctgct tctcagacac actttctggt ggcttgctaa caagaccct tgcaccggtg 1860
 agggcttga tacaagagaa aaagatgcag ctgtttggtc ttgaggacta cgcgaagtta 1920
 gtcaaagcag ttgatttcca cccggtggat tttttttca aagtggaaac ttgggacttc 1980
 agattccacc ccttgcaagc gtggaaagcc ttccgaccaa ggaagtgtc ggatgtagag 2040
 gaaatggaaa gtttgttctc agatggggac ctgcttgatt gttcacaag aatgccagct 2100
 tatgcggtaa acgcagagga agatttagct gcaatcagga aaacgcccga gatggatgtc 2160
 ggtcaagaag ttaaagagcc tgcaggagac agaaatcaat actcaaacc tgcagaaact 2220
 ttcctcaaca agctccacag gaaacacagt agggaggtga aacaccaggc cgcaaagaaa 2280
 gctaaacgcc tagctgaaat ccaggagtca atgagagctg aaggatgatc cgaaccaaat 2340
 gaaataagcg ggacgatggg ggcaataccc agcaacgccg aacttcttgg cacgaatgat 2400
 gccagacaag aactcacact cccaaccact aaacctgtcc ctgcaaggty ggaagatgct 2460

tcattcacag attcctagtgt ggaagaggag cagggttaaac tccttggaaa agaaaccgtt	2520
gaaacagcga cgcaacaagt catcgaagga cttccttggg aacctggat tcctcaatta	2580
aatgctgttg gattcaaggc gctggaaatt cagagggata ggagtggaac aatgatcatg	2640
cccacacag aatggtgtc cgggctggaa aaagaggact tcctgaagg aactccaaaa	2700
gagttggcac gagaattgtt cgctatgaac agaagccctg ccaccatccc tttggacctg	2760
cttagagcca gagactacgg cagtgatgta aagaacaaga gaattggtgc catcacaag	2820
acacaggcaa cgagttgggg cgaatacttg acaggaaaga tagaaagctt aactgagagg	2880
aaagttgcga cttgtgtcat tcattggagct ggaggttctg gaaaaagtca tgccatccag	2940
aaggcattga gagaattgg caagggctcg gacatcactg tagtctgcc gaccaatgaa	3000
ctgcccctag attggagtaa gaaagtgcct aacctgagc cctatatgtt caagacctct	3060
gaaaaggcgt taattggggg aacaggcagc atagtcatct ttgacgatta ctcaaaactt	3120
cctcccgtt acatagaagc cttagtctgt ttctactcta aatcaagct aatcattcta	3180
acaggagata gcagacaaag cgtctaccat gaaactgctg aggacgctc catcaggcat	3240
ttgggaccag caacagagta cttctcaaaa tactgccgat actatctcaa tgccacacac	3300
cgcaacaaga aagatcttgc gaacatgctt ggtgtctaca gtgagagaac gggagtcacc	3360
gaaatcagca tgagcgcgga gttcttagaa ggaatcccaa ctttgggtacc ctgggatgag	3420
aagagaaagc tgtacatggg caccgggagg aatgacacgt tcacatacgc tggatgccag	3480
gggctaacta agccgaaggt acaaatagtg ttggaccaca acaccaagt gtgtagcggg	3540
aatgtgatgt acacggcact ttctagagcc accgatagga ttcacttctg gaacacaagt	3600
gcaaattcct ctgccttctg ggaaaagttg gacagcacc cttacctcaa gactttccta	3660
tcagtgggta gagaacaagc actcagggag tacgagcggg cagaggcaga gccaattcaa	3720
gagcctgagc ccagacaca catgtgtgtc gagaatgagg agtccgtgct agaagagtac	3780
aaagaggaac tcttggaaaa gtttgacaga gagatccact ctgaatccca tggtcattca	3840
aactgtgtcc aaactgaaga cacaaccatt cagttgtttt cgcatacaaa agcaaaagat	3900
gagactctcc tctgggcgac tatagatgag cggctcaaga ccagcaatca agaaacaaac	3960
ttccgagaat tcctgagcaa gaaggacatt ggggacgttc tgtttttaa ctaccaaaaa	4020
gctatgggtt taccxaaaga gcgtattcct ttttcccaag aggtctggga agcttgtgcc	4080
cacgaagtac aaagcaagta cctcagcaag tcaaagtgca acttgatcaa tgggactgtg	4140
agacagagcc cagacttoga tgaaaataag attatggtat tcctcaagtc gcagtgggtc	4200
acaaaggtg aaaaactagg tctaccaag attaagccag gtcaaaccat agcagccttt	4260
taccagcaga ctgtgatgct ttttggaaact atggctaggt acatgcatg gttcagacag	4320
gctttccagc caaaagaagt cttcataaac tgtgagacga cgccagatga catgtctgca	4380

tgggccttga acaactggaa tttcagcaga cctagcttgg ctaatgacta cacagcttcc 4440
 gaccagtctc aggatggagc catgttgcaa tttgaggtgc tcaaagccaa acaccactgc 4500
 ataccagagg aaatcattca ggcatacata gatattaaga ctaatgcaca gattttccta 4560
 ggcacgttat caattatgcg cctgactggc gaaggtccca cttttgatgc aaactctgag 4620
 tgcaacatag cttacacca tacaagttt gacatcccag ccggaactgc tcaagtttat 4680
 gcaggagacg actccgcact ggactgtgtt ccagaagtga agcatagttt ccacaggctt 4740
 gaggacaaat tactcctaaa gtcaaagcct gtaatcacgc agcaaaagaa gggcagttgg 4800
 cctgagtttt gtggttgct gatcacacca aaaggggtga tgaaagacc aattaagctc 4860
 catgttagct taaaattggc tgaagctaag ggtgaactca agaaatgtca agattcctat 4920
 gaaattgac tgagttatgc ctatgaccac aaggactctc tgcatgactt gttcagtgag 4980
 aaacagtgtc aggcacacac actcacttgc agaactctaa tcaagtcagg gagaggcact 5040
 gtctcacttt cccgcctcag aaactttctt taaccgttaa gttaccttag agatttgaat 5100
 aagatggata ttctcatcag tagtttgaaa agtttaggtt attctaggac ttccaaatct 5160
 ttagattcag gaccttggc agtacatgca gtagccggag ccgtaagtc cacagcccta 5220
 aggaagttga tcctcagaca cccaacattc accgtgcata cactcgggtt ccctgacaag 5280
 gtgagtatca gaactagagg catacagaag ccaggaccta ttcttgaggg caacttcgca 5340
 atcctcgatg agtatacttt ggacaacacc acaaggaact cataccaggc actttttgct 5400
 gacccttacc aggcaccgga gtttagccta gagccccact tctacttggg aacatcattt 5460
 cgagttccga ggaaagtggc agatttgata gctggctgtg gcttcgattt cgagacgaac 5520
 tcaccggaag aagggcactt agagatcact ggcataattc aagggcccct actcggaaag 5580
 gtgatagcca ttgatgagga gtctgagaca acactgtcca ggcaggtgt tgagtttgg 5640
 aagccctgcc aagtgcaggg acttgagtcc aaagtagtca ctattgtgtc tgccgcacca 5700
 atagaggaaa ttggccagtc cacagcttcc tacaacgcta tcaccaggtc aaagggattg 5760
 acatatgtcc gcgcagggcc ataggctgac cgctccggtc aattctgaaa aagtgtacat 5820
 agtattaggt ctatcatttg ctttagtttc aattaccttt ctgctttcta gaaatagctt 5880
 accccacgtc ggtgacaaca ttcacagctt gccacacgga ggagcttaca gagacggcac 5940
 caaagcaatc ttgtacaact ccccaaatct agggtcacga gtgagtctac acaacggaaa 6000
 gaacgcagca tttgctgcc ttttgctact gactttgctg atctatggaa gtaaatacat 6060
 atctcaacgc aatcatactt gtgcttggg taacaatcat agcagtcatt agcacttctc 6120
 tagtgaggac tgaaccttgt gtcataaga ttactgggga atcaatcaca gtgttgctt 6180
 gcaaactaga tgcagaaacc ataagggcca ttgccgatct caagccactc tccgttgaac 6240
 ggttaagttt ccattgatac tcgaaagatg tcagcaccag ctagtacaac acagcccata 6300

gggTcaacta cctcaactac cacaaaaact gcaggcgcaa ctcctgccac agcttcaggc 6360
 ctgttcacta tcccggatgg ggatttcttt agtacagccc gtgccatagt agccagcaat 6420
 gctgtcgcaa caaatgagga cctcagcaag attgaggcta tttggaagga catgaagggtg 6480
 cccacagaca ctatggcaca ggctgcttgg gacttagtca gacactgtgc tgatgtagga 6540
 tcacccgctc aaacagaaat gatagataca ggtccctatt ccaacggcat cagcagagct 6600
 agactggcag cagcaattaa agagggtgtgc acacttaggc aattttgcat gaagtatgcc 6660
 ccagtgggat ggaactggat gttaactaac aacagtccac ctgctaactg gcaagcacia 6720
 ggtttcaage ctgagcacia attcgtgca ttcgacttct tcaatggagt caccaacca 6780
 gctgccatca tgcccaaaga ggggctcctc cggccaccgt ctgaagctga aatgaatgct 6840
 gcccaaaactg ctgcctttgt gaagattaca aaggccaggg cacaaatcaa cgactttgcc 6900
 agcctagatg cagctgtcac tcgaggtegt atcactggaa caacaaccgc tgaggctgtt 6960
 gtcactctac caccaccata atgaacgggt aagtttccat tgatactcga aagaggtcag 7020
 caccagctag caacaacaa gaaatgggtga gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg 7080
 tgcccctcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg 7140
 agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcactctgc accaccggca 7200
 agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccacttcag ctacggcgtg cagtgttca 7260
 gccgctaccc cgaccacatg aagcagcagc acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct 7320
 acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg 7380
 tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcacgcagct gaagggcatc gacttcaagg 7440
 aggacggcaa catcctgggg cacaaactgg agtacaacta caacagccac aacgtctata 7500
 tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaaatcg 7560
 aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccctcctc ggcgacggcc 7620
 ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc cgcctgagc aaagacccca 7680
 acgagaagcg cgatcacatg gtctctgtgg agttcgtgac cgcgcgggg atcactcacg 7740
 gcattggacga gctgtacaag taatctagcg ataccgtcga ctacgtctac ataaccgacg 7800
 cctaccccag ttctcatagta ttttctggtt tgattgtatg aataatataa ataaaaaaaa 7860
 aaaaaaaaaa aaaaaactag tggtagcgag ctcttctgtc agcgggcccc ctgcatccac 7920
 cccagtacat taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta 7980
 caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctgggcacia 8040
 aatcaccact cgatacaggc agcccatcag 8070

<210> 6
 <211> 8060
 <212>ADN
 <213>Secuencia Artificial

5

<220>

ES 2 389 783 T3

<223>Región de T-ADN del plásmido pICH25491

<400> 6

cctgtggttg gcacatacaa atggacgaac ggataaacct tttcacgccc ttttaaatat	60
ccgattattc taataaacgc tcttttctct taggtttacc cgccaatata tctgtcaaaa	120
cactgatagt ttaaaactgaa ggcgggaaac gacaatctga tctaagctag gcatgcctgc	180
aggtaacat ggtggagcac gacacgcttg tctactccaa aatatcaaaa gatacagtct	240
cagaagacca aagggcaatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg	300
gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct	360
cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca	420
gtgggtccaa agatggacc caccacacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa	480
ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac	540
aatcccacta tctttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt catttggaga	600
ggagaaaact aaaccatata ccaccaacac aaccaaacc accacgcca attggtacac	660
acccgcttga aaaagaaagt ttaacaaatg gccaaaggtgc gcgaggttta ccaatctttt	720
acagactcca ccacaaaaac tctcatccaa gatgaggctt atagaaacat tcgccccatc	780
atggaaaaac acaaaactagc taacccttac gctcaaacgg ttgaagcggc taatgatcta	840
gaggggttcg gcatagccac caatccctat agcattgaat tgcatacaca tgcagccgct	900
aagaccatag agaataaact tctagagggt cttgggttcca tcctaccaca agaacctggt	960
acatttatgt ttcttaaacc cagaaagcta aactacatga gaagaaacc gcggatcaag	1020
gacattttcc aaaatgttgc cattgaacca agagacgtag ccaggtacc caaggaaaca	1080
ataattgaca aactcacaga gatcacaacg gaaacagcat acattagtga cactctgcac	1140
ttcttggatc cgagctacat agtggagaca ttccaaaact gcccaaaatt gcaaacattg	1200
tatgcgacct tagttctccc cgttgaggca gcctttaaaa tggaaagcac tcaccggaac	1260
atatacagcc tcaataactt cggagatggt ttccagtata taccaggcaa ccatggtggc	1320
ggggcatacc atcatgaatt cgctcatcta caatggctca aagtgggaaa gatcaagtgg	1380
agggaccca aggatagctt tctcggacat ctcaattaca cgactgagca ggttgagatg	1440
cacacagtga cagtacagtt gcaggaatcg ttcgcgga accacttgta ctgcatcagg	1500
agaggagact tgctcacacc ggaggtgcgc actttcggcc aacctgacag gtacgtgatt	1560
ccaccacaga tcttctccc aaaagttcac aactgcaaga agccgattct caagaaaact	1620
atgatgcagc tcttcttgta tgtaggaca gtcaaggtcg caaaaaattg tgacatttt	1680
gccaaagtca gacaattaat taatcatct gacttgga aatactctgc tgtggaactg	1740

gtttacttag taagctacat ggagttcctt gccgatttac aagctaccac ctgcttctca 1800
 gacacacttt ctggtggctt gctaacaaag acccttgcac eggtgagggc ttggatacaa 1860
 gagaaaaaga tgcagctggt tggctctgag gactacgca agttagtcaa agcagttgat 1920
 ttccaccggg tggatttttc tttcaaagt gaaacttggg acttcagatt ccaccccttg 1980
 caagcgtgga aagccttccg accaagggaa gtgtcggatg tagaggaaat ggaaagtttg 2040
 ttctcagatg gggacctgct tgattgcttc acaagaatgc cagcttatgc ggtaaacgca 2100
 gaggaagatt tagctgcaat caggaaaacg cccgagatgg atgtcggca agaagttaa 2160
 gagcctgcag gagacagaaa tcaatactca aaccctgcag aaactttcct caacaagctc 2220
 cacaggaac acagtaggga ggtgaaacac caggccgcaa agaaagctaa acgcctagct 2280
 gaaatccagg agtcaatgag agctgaaggt gatgccgaac caaatgaaat aagcgggacg 2340
 atgggggcaa taccagcaa cggcgaactt cctggcacga atgatgccag acaagaactc 2400
 acactccaa cactaaacc tgccttgca aggtgggaag atgcttcatt cacagattct 2460
 agtgtggaag aggagcaggt taaactcctt ggaaaagaaa ccggtgaaac agcgacgcaa 2520
 caagtcacg aaggacttcc ttggaacac tggattcctc aattaatgc tgttgattc 2580
 aagggcgtg aaattcagag ggataggagt ggaacaatga tcatgccat cacagaaatg 2640
 gtgtccggc tggaaaaaga ggacttcctt gaaggaactc caaaagagtt ggcacgagaa 2700
 ttgttcgcta tgaacagaag cctgccacc atcccttgg acctgcttag agccagagac 2760
 tacggcagtg atgtaaagaa caagagaatt ggtgccatca caaagacaca ggcaacgagt 2820
 tggggcgaat acttgacagg aaagatagaa agcttaactg agaggaaagt tgcgacttgt 2880
 gtcattcatg gagctggagg ttctggaaaa agtcatgcca tccagaaggc attgagagaa 2940
 attggcaagg gctcggacat cactgtagtc ctgccacca atgaactgcg gctagattgg 3000
 agtaagaaag tgcctaacac tgagccctat atgttcaaga cctctgaaaa ggcgttaatt 3060
 gggggaacag gcagcatagt catctttgac gattactcaa aacttcctec cggttacata 3120
 gaagccttag tctgtttcta ctctaaaatc aagctaatca ttctaacagg agatagcaga 3180
 caaagcgtct accatgaaac tgctgaggac gcctccatca ggcatttggg accagcaaca 3240
 gagtacttct caaaatactg ccgatactat ctcaatgcca cacaccgcaa caagaaagat 3300
 cttgcgaaca tgcttgggtg ctacagtgag agaacgggag tcaccgaaat cagcatgagc 3360
 gccgagttct tagaaggaat cccaactttg gtaccctcgg atgagaagag aaagctgtac 3420
 atgggcaccg ggaggaatga cacgttcaca tacgctggat gccaggggct aactaagccg 3480
 aaggtacaaa tagtgttggc ccacaacacc caagtgtgta gcgcaatgt gatgtacagc 3540
 gcactttcta gagccaccga taggattcac ttcgtgaaca caagtgcaaa ttctctgccc 3600
 ttctgggaaa agttggacag cacccttac ctcaagactt tcctatcagt ggtgagagaa 3660

caagcactca gggagtacga gccggcagag gcagagccaa ttcaagagcc tgagccccag 3720
acacacatgt gtgtcgagaa tgaggagtcc gtgctagaag agtacaaga ggaactcttg 3780
gaaaagtttg acagagagat ccactctgaa tcccatggtc attcaaactg tgtccaaact 3840
gaagacacaa ccattcagtt gttttcgcac caacaagcaa aagatgagac tctcctctgg 3900
gcgactatag atgcgcggt caagaccagc aatcaagaaa caaacttccg agaattcctg 3960
agcaagaagg acattgggga cgttctgttt ttaaactacc aaaaagctat gggtttacc 4020
aaagagcgt a ttcctttttc ccaagaggtc tgggaagctt gtgccacga agtacaagc 4080
aagtacctca gcaagtcaaa gtgcaacttg atcaatggga ctgtgagaca gagcccagac 4140
ttcgatgaaa ataagattat ggtattcctc aagtcgcagt gggtcacaaa ggtggaaaa 4200
ctaggtctac ccaagattaa gccaggtaaa accatagcag ccttttacca gcagactgtg 4260
atgctttttg gaactatggc taggtacatg cgatggttca gacaggcttt ccagccaaaa 4320
gaagtcttca taaactgtga gacgacgcca gatgacatgt ctgcatgggc cttgaacaac 4380
tggaatttca gcagacctag ctgggctaata gactacacag ctttcgacca gtctcaggat 4440
ggagccatgt tgcaatttga ggtgctcaaa gccaaacacc actgcatacc agaggaaatc 4500
attcaggcat acatagatat taagactaat gcacagattt tcttaggcac gttatcaatt 4560
atgcgcctga ctgggtgaagg tcccactttt gatgcaaaca ctgagtgcaa catagcttac 4620
accatacaa agtttgacat cccagccgga actgctcaag tttatgcagg agacgactcc 4680
gcactggact gtgttccaga agtgaagcat agtttccaca ggcttgagga caaattactc 4740
ctaaagtcaa agcctgtaat cagcgagcaa aagaagggca gttggcctga gttttgtggt 4800
tggtgatca cacaaaagg ggtgatgaaa gacccaatta agctccatgt tagcttaaaa 4860
ttggctgaag ctaagggtga actcaagaaa tgtcaagatt cctatgaaat tgatctgagt 4920
tatgcctatg accacaagga ctctctgcat gacttgttcg atgagaaaca gtgtcaggca 4980
cacacactca cttgcagaac actaatcaag tcagggagag gcaactgtctc actttcccgc 5040
ctcagaaact ttctttaacc gtttaagtac cttagagatt tgaataagat gtcagacca 5100
gctagcacia cacagcccat agggtaact acctcaacta ccacaaaaac tgcaggcgca 5160
actcctgcca cagcttcagg cctgttcaact atcccgatg gggatttctt tagtacagcc 5220
cgtgccatag tagccagcaa tgctgtcgca acaaatgagg acctcagcaa gattgaggct 5280
atgtggaagg acatgaagg gcccacagac actatggcac aggctgctg ggacttagtc 5340
agacactgtg ctgatgtagg atcatccgct caaacagaaa tgatagatac aggtccctat 5400
tccaacggca tcagcagagc tagactggca gcagcaatta aagaggtgtg cacacttagg 5460
caatlttgca tgaagtatgc cccagtggta tggaaactgga tgttaactaa caacagtcca 5520
cctgctaact ggcaagcaca aggtttcaag cctgagcaca aattcgetgc attcgacttc 5580

ttcaatggag tcaccaaccc agctgccatc atgccc aaag aggggctcat cgggccaccg 5640
 tetgaagctg aatgaatgc tgcccaaact gctgcctttg tgaagattac aaaggccagg 5700
 gcacaatcca acgactttgc cagcctagat gcagctgtca ctcgaggctg tatcactgga 5760
 acaacaaccg ctgaggctgt tgtcactcta ccaccacat aacagaaact ttctttaacc 5820
 gttaagttac cttagagatt tgaataagat ggatattctc atcagtagtt tgaagagttt 5880
 aggttattct aggacttcca aatctttaga ttcaggacct ttggtagtag atgcagtagc 5940
 cggagccggg aagtccacag ccctaaggaa gttgatcctc agacacccaa cattcacctg 6000
 gcatacactc ggtgtccctg acaaggtgag tatcagaact agaggcatac agaagccagg 6060
 acctattcct gagggaact tcgcaatcct cgatgagtag actttggaca acaccacaag 6120
 gaactcatac caggcacttt ttgctgacce ttatcaggca ccggagttta gcctagagcc 6180
 ccacttctac ttgaaacat catttcgagt tccgaggaaa gtggcagatt tgatagctgg 6240
 ctgtggcttc gatttcgaga cgaactcacc ggaagaaggg cacttagaga tcaactggcat 6300
 attcaaaggg cccctactcg gaaagtgat agccattgat gaggagtctg agacaacact 6360
 gtccaggcat ggtgttgagt ttgttaagcc ctgccaaagt acgggacttg agttcaaagt 6420
 agtcactatt gtgtctgccc caccaataga ggaattggc cagtccacag ctttctacaa 6480
 cgctatcacc aggtcaaagg gattgacata tgtccgcgca gggccatagg ctgaccgctc 6540
 cggccaattc tgaaaaagtg tacatagtag taggtctatc atttgcttta gtttcaatta 6600
 cttttctgct ttctagaaat agcttaccoc acgtcgggta caacattcac agcttgccac 6660
 acggaggagc ttacagagac ggcaccaaag caatcttgta caactcccca aatctagggt 6720
 cacgagttag tctacacaac ggaagaacg cagcatttgc tgccgtttg ctactgactt 6780
 tgctgatcta tggaagtaaa tacatatctc aacgcaatca tacttgtgct tgtggttaaca 6840
 atcatagcag tcattagcac ttccttagtg aggactgaac cttgtgtcat caagattact 6900
 ggggaatcaa tcacagtgtt ggcttgcaaa ctgatgacg aaaccataag ggccattgcc 6960
 gatctcaagc cactctccgt tgaacgggta agtttccatt gatactcgaa agaggtcagc 7020
 accagctagc aacaacaag aatgggtgag caagggcgag gagctgttca cgggggtgg 7080
 gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgcgggcca 7140
 gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa 7200
 gctgcccctg ccctggccca cctcgtgac caccttcagc tacggcgtgc agtgcttcag 7260
 ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 7320
 cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt 7380
 gaagttcgag ggcgacacc tgggtaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga 7440
 ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 7500

catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 7560
ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 7620
cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa 7680
cgagaagcgc gatcacatgg tcttgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactcacgg 7740
catggacgag ctgtacaagt aatctagcga taccgtcgac tacgtctaca taaccgacgc 7800
ctaccccgagt tcatagtat tttctggttt gattgtatga ataataaaa taaaaaaaaa 7860
aaaaaaaaaa aaaaactagt ggtaccgagc tttctgtca gggggccac tgcattccacc 7920
ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac 7980
accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa 8040
atcaccactc gatacaggca 8060

5 <210> 7
 <211> 714
 <212> AND
 <213> Virus X de la patata

10 <400> 7

atgtcagcac cagctagcac aacacagccc atagggtcaa ctacctcaac taccacaaaa 60
actgcaggcg caactcctgc cacagcttca ggcctgttca ctatcccgga tggggatttc 120
tttagtacag cccgtgccat agtagccagc aatgctgtcg caacaaatga ggacctcagc 180
aagattgagg ctatttgga ggcacatgaag gtgccacag acactatggc acaggtgct 240
tgggacttag tcagacactg tgctgatgta ggatcatccg ctcaaacaga aatgatagat 300
acaggtccct attccaacgg catcagcaga gctagactgg cagcagcaat taaagaggtg 360
tgcacactta ggcaattttg catgaagtat gccccagtgg tatggaactg gatgtaact 420
aaacacagtc cacctgctaa ctggcaagca caaggtttca agcctgagca caaatcgct 480
gcattcgact tcttcaatgg agtcaccaac ccagctgccca tcatgcccaa agaggggctc 540
atccggccac cgtctgaagc tgaaatgaat gctgccc aaa ctgctgcctt tgtgaagatt 600
acaaaggcca gggcacaatc caacgacttt gccagcctag atgcagctgt cactcgaggt 660
cgtatcactg gaacaacaac cgctgaggct gttgtcactc taccaccacc ataa 714

15 <210> 8
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Virus X de la patata

<400> 8

Met Ser Ala Pro Ala Ser Thr Thr Gln Pro Ile Gly Ser Thr Thr Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Lys Thr Ala Gly Ala Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu
 20 25 30

Phe Thr Ile Pro Asp Gly Asp Phe Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val
 35 40 45

Ala Ser Asn Ala Val Ala Thr Asn Glu Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala
 50 55 60

Ile Trp Lys Asp Met Lys Val Pro Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala
 65 70 75 80

Trp Asp Leu Val Arg His Cys Ala Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr
 85 90 95

Glu Met Ile Asp Thr Gly Pro Tyr Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg
 100 105 110

Leu Ala Ala Ala Ile Lys Glu Val Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met
 115 120 125

Lys Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro
 130 135 140

Pro Ala Asn Trp Gln Ala Gln Gly Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala
 145 150 155 160

Ala Phe Asp Phe Phe Asn Gly Val Thr Asn Pro Ala Ala Ile Met Pro
 165 170 175

Lys Glu Gly Leu Ile Arg Pro Pro Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala
 180 185 190

Gln Thr Ala Ala Phe Val Lys Ile Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn
 195 200 205

Asp Phe Ala Ser Leu Asp Ala Ala Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly
 210 215 220

Thr Thr Thr Ala Glu Ala Val Val Thr Leu Pro Pro Pro
 225 230 235

<210> 9

ES 2 389 783 T3

<211> 681
 <212>AND
 <213>Virus X de la patata

5 <400> 9

```

atggatattc tcatcagtag tttgaaaagt ttaggttatt ctaggacttc caaatcttta      60
gattcaggac ctttggtagt acatgcagta gccggagccg gtaagtccac agccctaagg      120

aagttgatcc tcagacaccc aacattcacc gtgcatacac tcggtgtccc tgacaagggtg      180
agtatcagaa ctgagggcat acagaagcca ggacctattc ctgagggcaa cttcgcaatc      240
ctcgatgagt atactttgga caacaccaca aggaactcat accaggcact ttttgctgac      300
ccttatcagg caccggagtt tagcctagag ccccacttct acttggaaac atcatttcga      360
gttccgagga aagtggcaga tttgatagct ggctgtggct tcgatttcga gacgaactca      420
ccggaagaag ggcacttaga gatcactggc atattcaaag ggcccctact cggaaagggtg      480
atagccattg atgaggagtc tgagacaaca ctgtccaggc atggtgttga gtttgттаag      540
ccctgccaaг tgacgggact tgagttcaaa gtagtacta ttgtgtctgc cgcaccaata      600
gaggaaattg gccagtccac agctttctac aacgctatca ccaggtcaaa gggattgaca      660
tatgtccgcg cagggccata g                                             681
    
```

10

<210> 10
 <211> 226
 <212> PRT
 <213>Virus X de la patata

15

<400> 10

Met Asp Ile Leu Ile Ser Ser Leu Lys Ser Leu Gly Tyr Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Ser Leu Asp Ser Gly Pro Leu Val Val His Ala Val Ala Gly
 20 25 30

Ala Gly Lys Ser Thr Ala Leu Arg Lys Leu Ile Leu Arg His Pro Thr
 35 40 45

Phe Thr Val His Thr Leu Gly Val Pro Asp Lys Val Ser Ile Arg Thr
 50 55 60

Arg Gly Ile Gln Lys Pro Gly Pro Ile Pro Glu Gly Asn Phe Ala Ile
 65 70 75 80

Leu Asp Glu Tyr Thr Leu Asp Asn Thr Thr Arg Asn Ser Tyr Gln Ala
 85 90 95

Leu Phe Ala Asp Pro Tyr Gln Ala Pro Glu Phe Ser Leu Glu Pro His
 100 105 110

Phe Tyr Leu Glu Thr Ser Phe Arg Val Pro Arg Lys Val Ala Asp Leu
 115 120 125

Ile Ala Gly Cys Gly Phe Asp Phe Glu Thr Asn Ser Pro Glu Glu Gly
 130 135 140

His Leu Glu Ile Thr Gly Ile Phe Lys Gly Pro Leu Leu Gly Lys Val
 145 150 155 160

Ile Ala Ile Asp Glu Glu Ser Glu Thr Thr Leu Ser Arg His Gly Val
 165 170 175

Glu Phe Val Lys Pro Cys Gln Val Thr Gly Leu Glu Phe Lys Val Val
 180 185 190

Thr Ile Val Ser Ala Ala Pro Ile Glu Glu Ile Gly Gln Ser Thr Ala
 195 200 205

Phe Tyr Asn Ala Ile Thr Arg Ser Lys Gly Leu Thr Tyr Val Arg Ala
 210 215 220

Gly Pro
 225

<210> 11
 <211> 345
 <212> AND
 <213> Virus X de la patata

5

<400> 11

```

atgtccgcgc agggccatag gctgaccgct ccggtcaatt ctgaaaaagt gtacatagta      60
ttaggtctat catttgcttt agtttcaatt acctttctgc tttctagaaa tagcttacct      120
cacgtcggtg acaacattca cagcttgcca cacggaggag cttacagaga cygcaccaaaa      180
gcaatcttgt acaactcccc aaatctaggg tcacgagtga gtctacacaa cggaaagaac      240
gcagcatttg ctgccgtttt gctactgact ttgctgatct atggaagtaa atacatatct      300
caacgcaatc atacttgctg ttgtggtaac aatcatagca gtcac      345
    
```

10 <210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Virus X de la patata

15 <400> 12

```

Met Ser Ala Gln Gly His Arg Leu Thr Ala Pro Val Asn Ser Glu Lys
 1          5          10          15

Val Tyr Ile Val Leu Gly Leu Ser Phe Ala Leu Val Ser Ile Thr Phe
          20          25          30

Leu Leu Ser Arg Asn Ser Leu Pro His Val Gly Asp Asn Ile His Ser
 35          40          45

Leu Pro His Gly Gly Ala Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ala Ile Leu Tyr

          50          55          60

Asn Ser Pro Asn Leu Gly Ser Arg Val Ser Leu His Asn Gly Lys Asn
 65          70          75          80

Ala Ala Phe Ala Ala Val Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile Tyr Gly Ser
          85          90          95

Lys Tyr Ile Ser Gln Arg Asn His Thr Cys Ala Cys Gly Asn Asn His
          100          105          110

Ser Ser His
          115
    
```

<210> 13
 <211> 210
 <212> ADN
 <213> Virus X de la patata

5

<400> 13

```

atggaagtaa atacatatct caacgcaatc atacttgtgc ttgtggtaac aatcatagca      60
gtcattagca ctctcttagt gaggactgaa ccttgtgtca tcaagattac tggggaatca      120
atcacagtgt tggcttgcaa actagatgca gaaaccataa gggccattgc cgatctcaag      180
ccactctccg ttgaacgggt aagtttccat      210
    
```

10 <210> 14
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Virus X de la patata

15

<400> 14

```

Met Glu Val Asn Thr Tyr Leu Asn Ala Ile Ile Leu Val Leu Val Val
1          5          10          15

Thr Ile Ile Ala Val Ile Ser Thr Ser Leu Val Arg Thr Glu Pro Cys
20          25          30

Val Ile Lys Ile Thr Gly Glu Ser Ile Thr Val Leu Ala Cys Lys Leu
35          40          45

Asp Ala Glu Thr Ile Arg Ala Ile Ala Asp Leu Lys Pro Leu Ser Val
50          55          60

Glu Arg Leu Ser Phe His
65          70
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende o que codifica un replicón de ARN que comprende, en este orden, los siguientes segmentos (i) a (iii):
- 5 (i) una secuencia de ácido nucleico que codifique una ARN polimerasa dependiente de ARN de potexvirus o una variante conservadora de la función de la misma; en la que dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 36% con una proteína codificada por la SEC ID NO:4 dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoacídicos;
- 10 (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprenda:
- (a) un bloque genético triple de potexvirus o una variante conservadora de la función del mismo, en el que dicha variante conservadora de la función de dicho bloque genético triple de potexvirus codifica las tres proteínas siguientes:
- 15 una primera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 200 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:10; una segunda proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos 100 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:12; y una tercera proteína que comprende un segmento de secuencia de proteína de al menos
- 20 55 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia de proteína una identidad de secuencia de al menos 40% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO:14; y
- (b) una secuencia que codifique una proteína de recubrimiento potexviral o una variante conservadora de la función de la misma; o una secuencia que codifique una proteína de movimiento tobamoviral; en la que dicha variante conservadora de la función de dicha proteína de recubrimiento tobamoviral comprende un
- 25 segmento de secuencia de proteína de al menos 200 restos aminoacídicos, teniendo dicho segmento de secuencia una identidad de al menos 35% con un segmento de secuencia de la SEC ID NO: 8; y
- (iii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que puede expresarse a partir de dicho replicón en una planta o en un tejido de planta
- 30 o una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria de dicho ácido nucleico.
2. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha variante conservadora de la función del bloque genético triple de potexvirus codifica tres proteínas, una de las cuales tiene una identidad de secuencia de al menos 33% con la SEC ID NO: 10; una que tiene una identidad de secuencia de al menos 36% con la SEC ID NO: 12; y una que tiene una identidad de secuencia de al menos 30% con la SEC ID NO: 14.
- 35 3. El ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en que dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 36% con una proteína codificada por la SEC ID NO:4 dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 500 restos aminoacídicos, preferiblemente de al menos 900 restos aminoacídicos, y lo más preferible, de al menos 1400 restos aminoacídicos.
- 40 4. El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una identidad de secuencia de al menos 45% con una proteína codificada por la SEC ID NO:4 dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoacídicos, preferiblemente de al menos 500 restos aminoacídicos, más preferiblemente de al menos 900 restos aminoacídicos, y lo más preferible, de al menos 1400 restos aminoacídicos.
- 45 5. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha secuencia del punto (i) codifica una proteína que tiene una homología de secuencia de al menos 50% con una proteína codificada por la SEC ID NO:4 dentro de un segmento de secuencia de proteína de al menos 300 restos aminoacídicos, preferiblemente de al menos 500 restos aminoacídicos, más preferiblemente de al menos 900 restos aminoacídicos, lo más preferible, de al menos 1400 restos aminoacídicos.
- 50 6. El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del punto (i) tiene una identidad de secuencia de al menos 55%, preferiblemente de al menos 60%, con la SEC ID NO: 4 dentro de un segmento de secuencia de al menos 900 nucleótidos, preferiblemente de al menos 1500 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 2700 nucleótidos, y lo más preferible, de al menos 4200 nucleótidos.
- 55 7. El ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho replicón es un replicón potexviral, preferiblemente un replicón derivado del virus X de la patata, del potexvirus del mosaico del bambú o del potexvirus del
- 60

mosaico de la papaya.

8. Un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho replicón no tiene un origen de ensamblaje de partícula viral;
- 5 y/o dicho ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo:
un promotor de transcripción activo en células de planta cadena arriba del punto (i), un promotor subgenómico viral, una región 5' ó 3' no traducida potexviral.
9. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los puntos (a) y (b) pueden estar en cualquier orden en dicha secuencia de ácido nucleico del punto (ii), preferiblemente, en el punto (ii), dicho bloque genético triple de potexvirus o una variante conservadora de la función del mismo se localiza cadena arriba de dicho gen de proteína de recubrimiento potexviral o de una variante conservadora de la función del mismo, o viceversa.
- 10 El ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha proteína de movimiento tobamoviral es una proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco o del virus de aclaramiento de las nervaduras del nabo o una variante conservadora de la función de dichas proteínas de movimiento.
- 15 11. Un kit de partes que comprende al menos dos vectores que, en células de planta, por recombinación específica de sitio, pueden ensamblar dicho ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 20 12. El kit de partes de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende al menos dos vectores, un primer vector que comprende o que codifica los segmentos de los puntos (i) y (ii) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un segundo vector que comprende o que codifica el segmento del punto (iii) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que cada uno de dicho primer y segundo vector tiene un sitio de recombinación para permitir el ensamblaje, por
- 25 recombinación específica de sitio, de un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Un procedimiento para la expresión de una secuencia de interés de ácido nucleico heterólogo en una planta o en un tejido de planta, que comprende proporcionar una planta o un tejido de planta con dicho ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 30

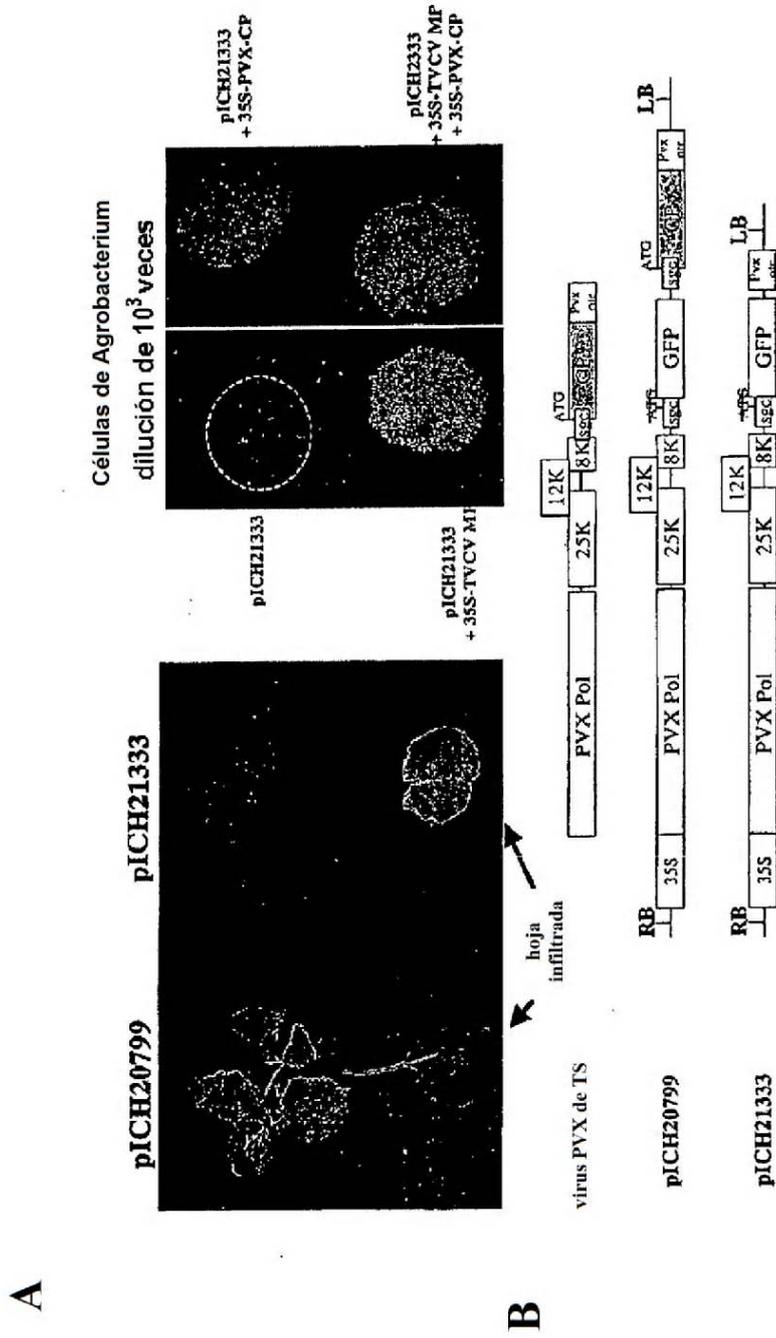


Fig. 1

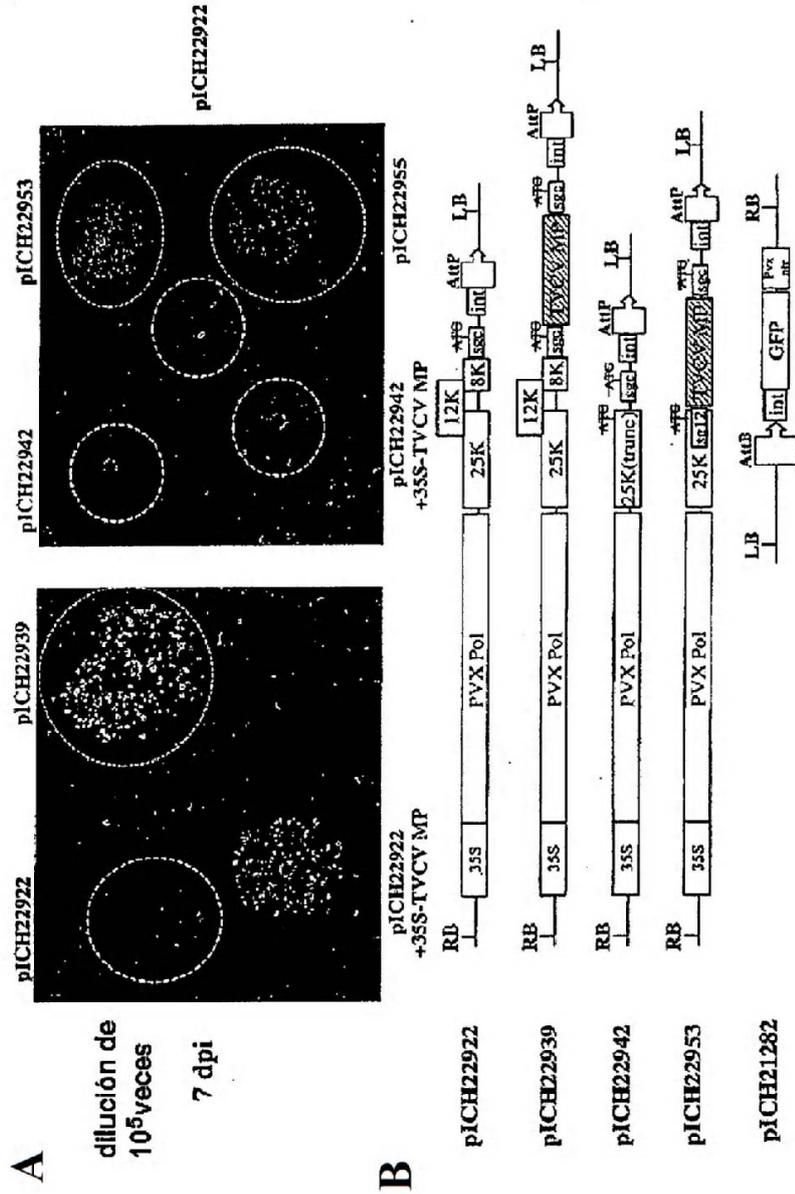


Fig. 2

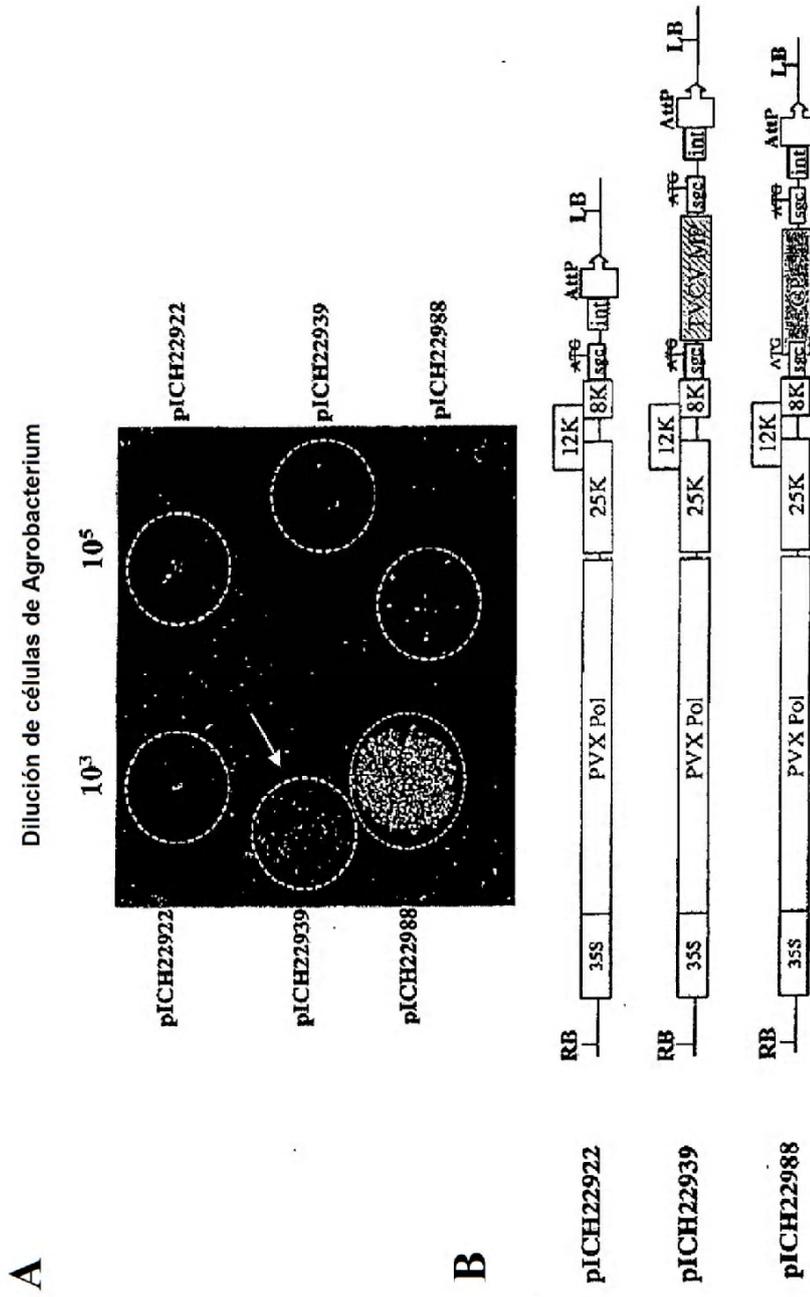


Fig. 3

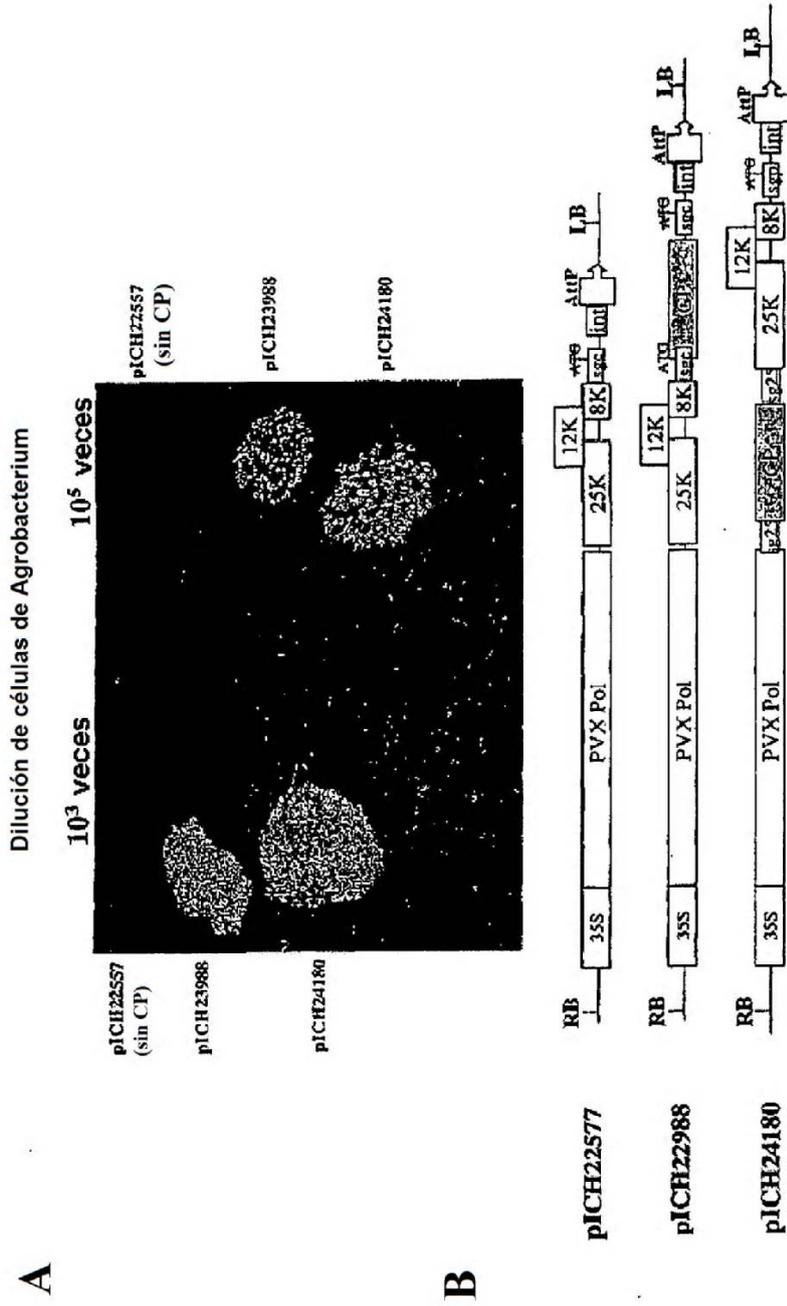
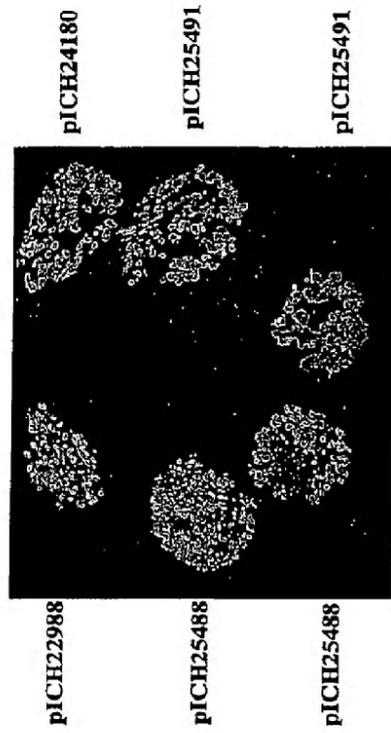


Fig. 4

A



B

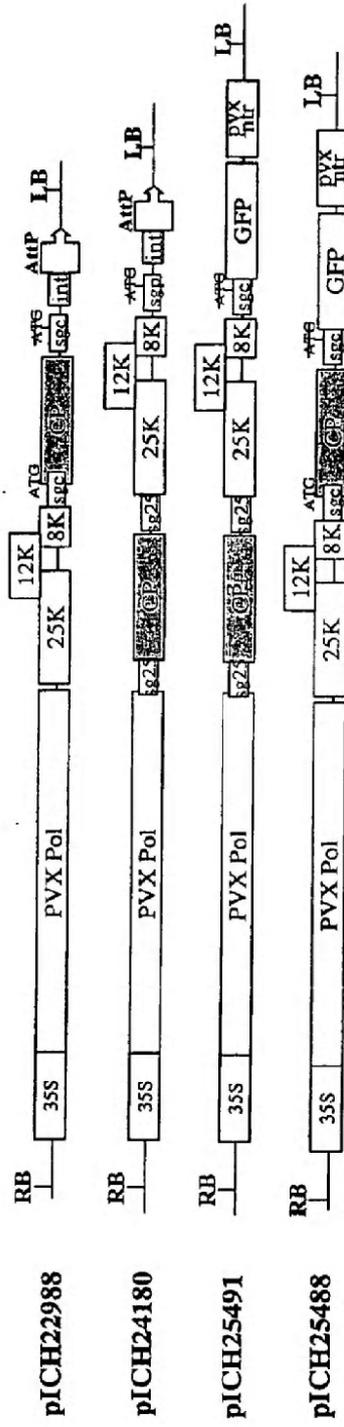


Fig. 5

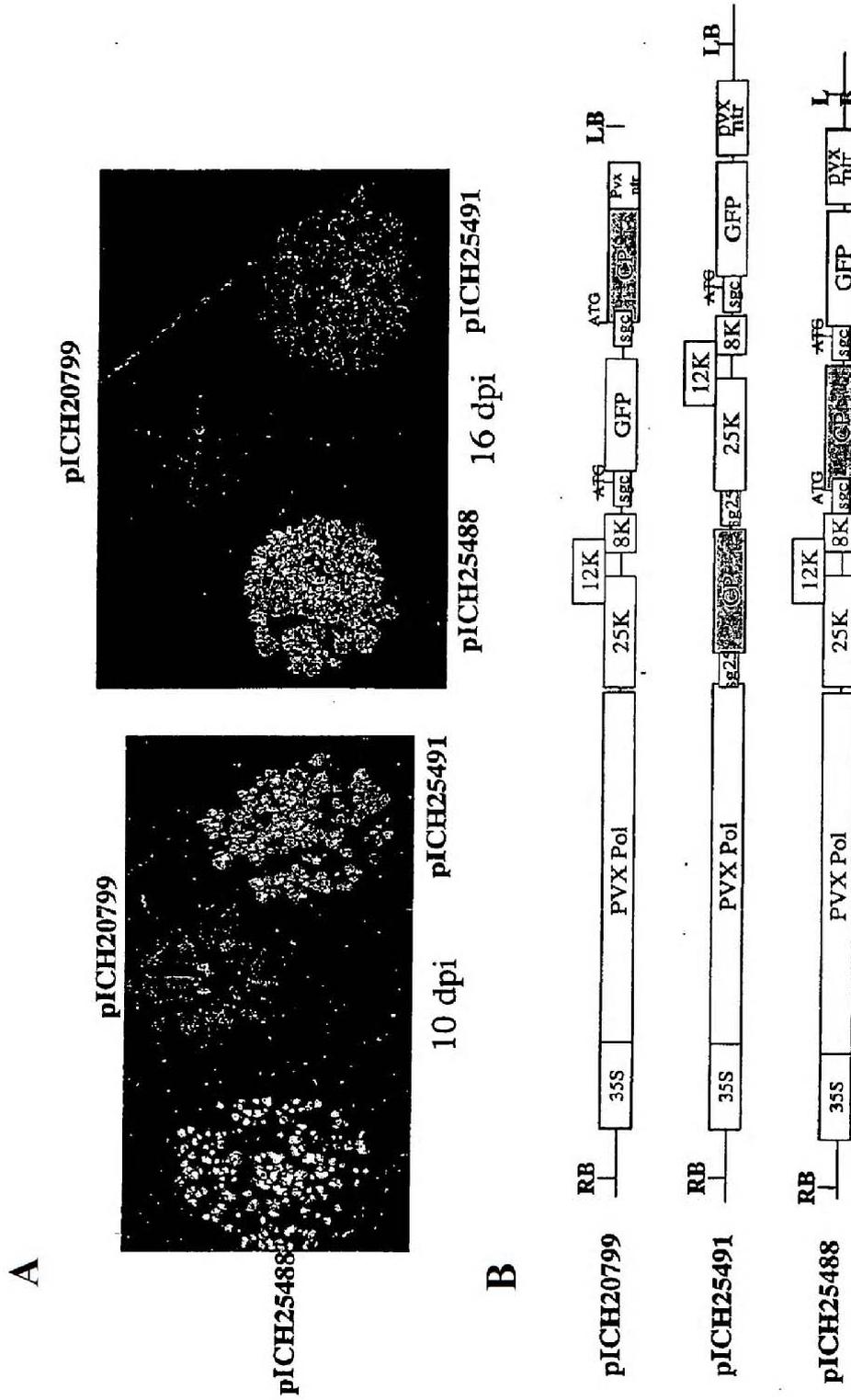


Fig. 6

Vectores de clonación del PVX

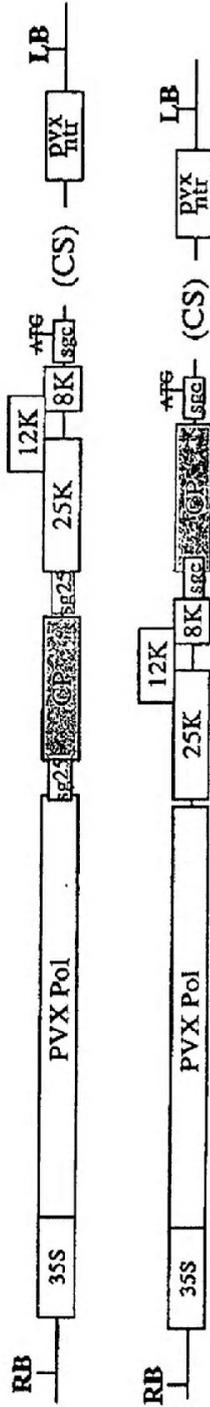


Fig. 7

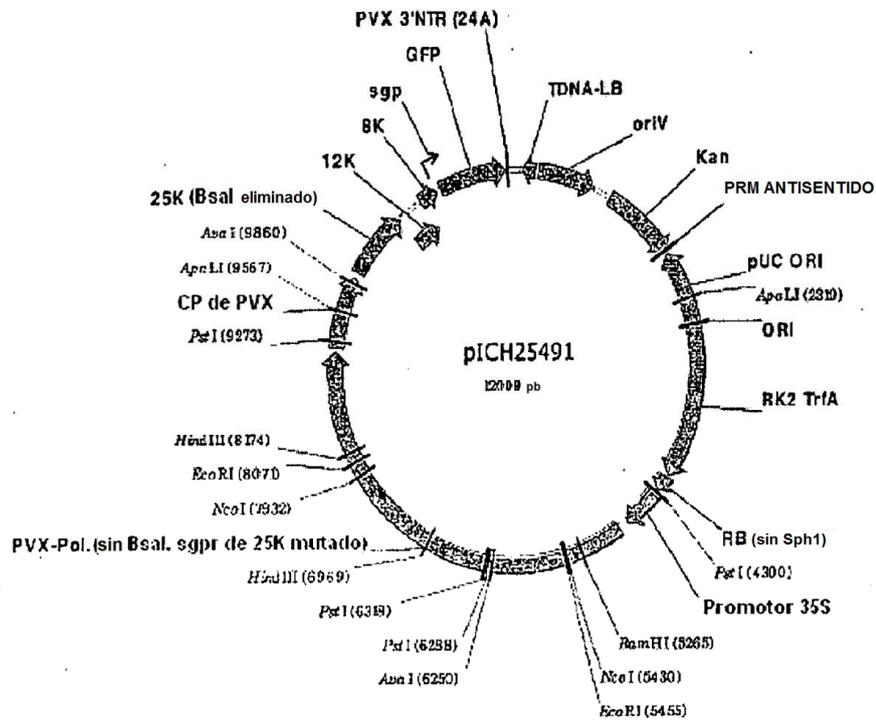


Fig. 8

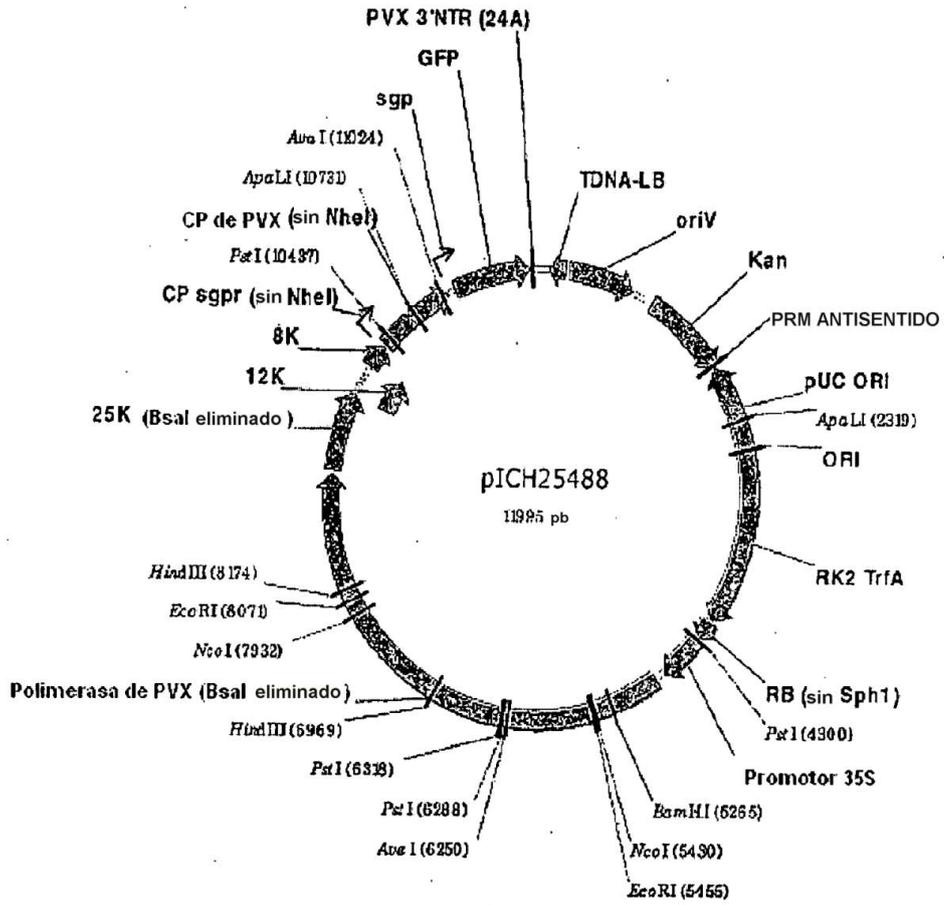


Fig. 9