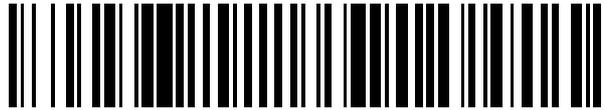


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 341**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08836581 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2195438**

54 Título: **Métodos para transferir sustancias moleculares al interior de células vegetales**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 978059 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2013

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS, INDIANA 46268, US**

72 Inventor/es:

**SAMUEL, JAYAKUMAR, PON;
BURROUGHS, FRANK;
ZETTLER, MARK, W. y
DIXIT, SURAJ, K.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 341 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

Métodos para transferir sustancias moleculares al interior de células vegetales.

Antecedentes

5 Las nanopartículas tienen propiedades únicas que han sido aprovechadas para su uso en el suministro de ADN a las células. Entre todas las nanopartículas investigadas, las nanopartículas de oro (Au) tienden a ser excelentes candidatos para el suministro debido a su escasa citotoxicidad y facilidad de funcionalización con varios ligandos de importancia biológica. La síntesis comúnmente utilizada de nanopartículas de Au proporciona una superficie cargada negativamente (*por ej.*, revestimiento de citrato). El ADN plasmídico, que puede ser suficientemente flexible para desenrollar parcialmente sus bases, puede ser expuesto a nanopartículas de oro ("GNPs, por sus siglas en inglés").
10 En estas condiciones parcialmente desenrolladas, la carga negativa en la cadena del ADN puede estar suficientemente distante como para permitir que las fuerzas de atracción de Van der Waals entre las bases y la nanopartícula de oro sean suficientes para hacer que el ADN plasmídico se una a la superficie de la partícula de oro.

Además de nanopartículas metálicas, también se han usado nanopartículas semi-conductoras (*por ej.*, puntos cuánticos) ("QD", por sus siglas en inglés) dentro del intervalo de tamaños de 3-5 nm como vehículos para suministrar las moléculas al interior de las células. El ADN y las proteínas se pueden enlazar al ligando fijado a la superficie de un QD (*véase, por ej.*, Patolsky, F. et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 13918 (2003)). Los QDs revestidos con ácidos carboxílicos o aminos se pueden entrecruzar con moléculas que contienen un grupo tiol (*véase, p.ej.*, Dubertret B. et al., Science 298, 1759 (2002); Alterman, M. E., W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 12617 (2002); Mitchell, G. P., C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 121, 8122 (1999)) o con un grupo éster N-hidroxisuccinimilo (NHS) usando protocolos clásicos de bioconjugación (*véase, p.ej.*, Pinaud, F., D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115 (2004); Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, Science 281, 2013 (1998)). Una vía alternativa es la conjugación de QDs revestidos con estreptavidina a proteínas, oligos o anticuerpos biotinilados (*véase, p.ej.*, Dahan M. et al., Science 302, 442 (2003); Pinaud, F., D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115 (2004); Dahan M. et al., Science 302, 442 (2003); Wu, X. Y., et al., Nature Biotechnol. 21, 41 (2003); Jaiswal, J. K., H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, Nature Biotechnol. 21, 47 (2003); y Mansson, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 529 (2004)).

Se han usado nanopartículas para suministrar ADN plasmídico a diversidad de células animales. Se ha encontrado que cuando nanopartículas revestidas con ADN se incuban con células que no tienen pared celular, las células captan las nanopartículas y empiezan a expresar cualquier gen codificado en el ADN. Cuando se desea suministrar nanopartículas a células que normalmente tienen pared celular, ésta se separa antes de la adición de las partículas a los protoplastos de la planta (*véase, Torney, F. et al., Nature Nanotechnol. 2, (2007)*). En las células vegetales, la pared celular es una barrera para la entrega de moléculas aplicadas exógenamente. Muchos métodos invasivos, como el cañón de genes (biolística), la microinyección, la electroporación, y *Agrobacterium*, han sido empleados para lograr el suministro de genes y moléculas pequeñas a estas células vegetales con paredes, pero la administración de proteínas sólo se ha logrado mediante microinyección. El suministro de moléculas pequeñas y proteínas en presencia de una pared celular de una célula vegetal permanece inexplorado y sería ventajoso con el fin de desarrollar tecnologías de apoyo para su despliegue en células, tejidos u órganos vegetales intactos para manipulaciones *in vitro* e *in vivo*.

40 La presente invención se refiere a métodos que usan nanopartículas para suministrar de forma no invasiva sustancias moleculares a las células que tienen una pared celular.

Descripción de la invención

Se proporciona un método para introducir una molécula de interés en una célula vegetal que tiene pared celular, que comprende:

- 45 i) subcultivar un cultivo en suspensión vegetal de una semana de antigüedad que comprende una célula vegetal que tiene pared celular en un medio de cultivo reciente que contiene una cantidad eficaz de un inhibidor de microtubulina durante 4 a 7 días, con lo que se produce un subcultivo vegetal que comprende la célula vegetal que tiene una pared celular;
- ii) revestir una nanopartícula que tiene un diámetro menor que 100 nm con una molécula de interés;
- 50 iii) poner el subcultivo vegetal y la nanopartícula revestida en contacto entre sí; y iv) incubar conjuntamente el subcultivo vegetal y la nanopartícula revestida durante al menos 20 minutos, para permitir la captación de la nanopartícula y la molécula de interés en la célula vegetal que comprende una pared celular.

Además de los aspectos y realizaciones ilustrativos que se describen aquí, otros aspectos y realizaciones serán evidentes a la vista de las siguientes descripciones.

55

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 representa fotografías de células individuales de BY2 visualizadas utilizando un microscopio de contraste de interferencia diferencial unido a un sistema de imagen confocal (cuadro A). El cuadro B muestra una vista en microscopio óptico de una sola célula de una variante de BY2 que está teñida con I2KI para resaltar el plástido (Amiloplasto).
- La figura 2, cuadro A, representa células fotoautótrofas de tabaco (NT1) mantenidas en medio mínimo y 5% de dióxido de carbono visualizadas en microscopio óptico, donde son visibles los cloroplastos prominentes. La figura 2, cuadro B, muestra células NT1 similares visualizadas bajo un microscopio de fluorescencia con cloroplastos activos que fluorescen en rojo.
- 10 La figura 3 muestra agregados en suspensión de BY2 tratados con fluoresceína SAMSA en solitario y con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA. La figura 3, cuadro A, muestra una imagen DIC de células tratadas con fluoresceína SAMSA en solitario mientras que la figura 3, cuadro B, muestra la imagen fluorescente de las mismas células. La figura 3, cuadro C, muestra una imagen DIC de células tratadas con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA mientras que la figura 3, cuadro D, muestra la imagen fluorescente de las células tratadas con las GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA. Se indican las posiciones del núcleo (Nu) y de la pared celular (CW, por sus siglas en inglés).
- 15 La figura 4 muestra células individuales tratadas con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA bajo un microscopio de gran aumento. El cuadro B muestra la presencia de gran número de GNPs en el nucleolo. El cuadro A muestra una vista de campo brillante del mismo nucleolo mostrado en el cuadro B bajo un plano focal diferente.
- 20 La figura 5 muestra células fotoautótrofas tratadas con GNP revestida con fluoresceína SAMSA. El cuadro A muestra células hialinas en agrupaciones de 3-4 células con cloroplastos grandes que revisten la cara interior de la pared celular. El cuadro B muestra la acumulación de nanopartículas en el cloroplasto. Los cuadros C y D muestran un aumento a más potencia de un solo cloroplasto usando un microscopio fluorescente. Las nanopartículas son visibles en la membrana tilacoidal del cloroplasto y están intercaladas entre los pigmentos clorofílicos autofluorescentes rojos.
- 25 La figura 6 muestra imágenes microscópicas reflectantes y fluorescentes de células que contienen nanopartículas. El cuadro A de la figura 6 muestra una imagen reflectante en la que se ven preferentemente las GNPs. El cuadro B muestra partículas fluorescentes dentro del fondo de cloroplasto autofluorescente rojo. Una imagen reflectante y fluorescente combinada se muestra en el cuadro C, en el que las partículas fluorescentes amarillas están dentro de los límites del cloroplasto.
- 30 La figura 7 muestra una representación gráfica de un posible esquema de transformación de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La figura 8 muestra la interiorización celular de GFP visualizada a través de microscopía reflectante después de dos horas de tratamiento. Los cuadros A y A1 muestran células control no tratadas bajo un microscopio DIC (cuadro A), y células tratadas con Au-NP unido a GFP visualizadas bajo un microscopio DIC (cuadro A1); Los cuadros B y B1 muestran células control bajo un microscopio de reflectancia (cuadro B), y células tratadas con Au-NP unido a GFP visualizadas con un microscopio de reflectancia (cuadro B1), mostrando la interiorización de las partículas a partir de las Au-NPs reflejadas; Los cuadros C y C1 muestran imágenes superpuestas de células control visualizadas con microscopio DIC y de reflectancia (cuadro C), e imágenes superpuestas de células tratadas visualizadas con microscopio DIC y de reflectancia (cuadro C1); Los cuadros D y D1 muestran la imagen invertida de la reflectancia de células control que indica que no hay partículas en el fondo (cuadro D), y la imagen invertida de la reflectancia de células tratadas que indica muy claramente la interiorización de las partículas (cuadro D1).
- 35 La figura 9 muestra la interiorización de GNPs revestidas con tinte SAMSA en células individuales. El cuadro A muestra células individuales teñidas con fluoresceína, donde la pared celular y el medio indican fluorescencia, pero no la interiorización del tinte; El cuadro B muestra células individuales bajo el microscopio DIC; El cuadro C representa la imagen obtenida con contraste de fase que muestra la interiorización de nanopartículas (GNP 150 nm) en el citosol y el núcleo, con la fluoresceína interiorizada solamente con la partícula y las células plasmalizadas bajo exposición prolongada hasta 1 h en la luz UV.
- 45 La figura 10 muestra el conjugado Au-GFP con moléculas de GFP fluorescentes, antes de mezclar las células individuales. Cuadro A (FITC), B (campo brillante), C (Reflectancia), D (cuadros A+B+C): Au-GNPs con GFP fluorescente observadas a través de microscopía de fluorescencia, 2 h después de la incubación, pero antes de mezclar las células. Se pudieron ver partículas fluorescentes similares sobre la partícula lo que indica reflectancia en el núcleo (véase la figura 8).
- 50 La figura 11 muestra interiorización celular de GFP en líneas celulares BY2-E mediada por nanopartículas (GNP 90 nm), el cuadro A muestra la división de células control con hebras citoplasmáticas activas (imagen con contraste de fase); el cuadro B muestra las mismas células que el cuadro A cuando se examinan a través de un filtro FITC, donde la autofluorescencia de los plástidos no verdes en el citoplasma forman la periferia y también de los plástidos

asociados con el núcleo en división; y donde las hebras citoplasmáticas y el citoplasma cerca de la periferia de las células no presentan autofluorescencia; El cuadro C muestra células BY2 control tratadas con GFP que no están unidas a GNPs (FITC), donde las células no muestran captación de GFP, pero las GFP están rodeando las células, pero no se interiorizan; El cuadro D muestra interiorización de GFP mediada por GNP como se observa a través de un filtro FITC, donde el citoplasma periférico, las hebras citoplasmáticas y el núcleo muestran interiorización de GFP en comparación con el control del cuadro B.

La figura 12 muestra líneas celulares individuales BY2-E que muestran interiorización de YFP mediada por GNP 2 h después de la incubación de las células. Cuadro A (FITC), 13 (Rodamina), C (DIC), D (cuadros A+B), E (cuadros A+B+C); F (imagen de reflectancia invertida): interiorización de YFP observada mediante microscopía de fluorescencia. Las flechas en amarillo indican la interiorización en una sola célula hepática con YFP en el citosol (difundido y concentrado en el núcleo). Las flechas en naranja indican interiorización en células plasmalizadas en las que la masa del protoplasto contraído dentro de la célula muestra una intensa fluorescencia que indica la interiorización de YFP en la célula. Esta célula se encuentra en el mismo plano focal de la célula viva que está situada adyacente, pero debajo de otras células vivas. Las células que acumulan un alto nivel de partícula y fluorescencia YFP presentan muerte celular en exploraciones prolongadas bajo el microscopio de fluorescencia.

Las figuras 13 y 14 muestran imágenes en gel de los productos génicos aumentados con PAT e YFP.

La figura 15 muestra la electroforesis en gel llevada a cabo sobre conjugados péptido-QD para confirmar la unión de los péptidos a QDs.

La figura 16 muestra el plásmido pDAB3831.

20 Descripción detallada de la invención

En la descripción y las tablas siguientes, se usan diversos términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que debe darse a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

25 Retrocruzamiento. Retrocruzamiento es un procedimiento en el que un criador cruza repetidas veces progenie híbrida con uno de los progenitores, por ejemplo, un híbrido de primera generación, F₁, con uno de los genotipos progenitores del híbrido, F₁.

Embrión. El embrión puede ser la plántula contenida dentro de una semilla madura.

30 Nanopartícula. Una partícula microscópica con al menos una dimensión de nanoescala, habitualmente menor que 100 nm. Las nanopartículas adecuadas para uso en la presente invención pueden tener un tamaño de 1 nm - 0,4 nm. Un punto cuántico puede tener un valor de la mediana de diámetros de 1 nm - 10 nm, preferiblemente 2-4 nm. La nanopartícula se puede seleccionar de: nanopartículas de oro, nanopartículas bañadas en oro, nanopartículas porosas, nanopartículas mesoporosas, nanopartículas de sílice, nanopartículas de polímeros, nanopartículas de tungsteno, nanopartículas de gelatina, nanocápsulas, nanonúcleos, nanoesferas, nanovarillas, nanopartículas magnéticas, y combinaciones de las mismas.

35 Punto cuántico. Un punto cuántico es una nanoestructura semiconductor que confina el movimiento de los electrones de la banda de conducción, los huecos de la banda de valencia o los excitones (pares ligados formados por un electrón de la banda de conducción y un hueco de la banda de valencia) en las tres direcciones espaciales. El confinamiento se puede deber a los potenciales electrostáticos (generados por electrodos externos, dopado, tensión, impurezas, etc.), a la presencia de una interfaz entre diferentes materiales semiconductores (ej. en sistemas de nanocristales de núcleo-coraza), a la presencia de la superficie del semiconductor (ej. nanocristal semiconductor), o a una combinación de éstos. Un punto cuántico tiene un espectro discreto de energía cuantizada. Las funciones de onda correspondientes están espacialmente localizadas dentro del punto cuántico, pero se extienden sobre muchos períodos de la red cristalina. Un punto cuántico contiene un número reducido, y finito, de electrones de la banda de conducción (del orden de 1 a 100), huecos en la banda de valencia, o de excitones, es decir, un número finito de cargas eléctricas elementales.

Resistente a glifosato. La resistencia a una dosis de glifosato se refiere a la capacidad de una planta para sobrevivir (es decir, la planta no muere) por esa dosis de glifosato. En algunos casos, las plantas tolerantes pueden amarillear temporalmente o presentar algún otro daño inducido por glifosato (*por ej.*, macolla excesiva y/o inhibición del crecimiento), pero se recuperan.

50 Estabilizadas. Estabilizadas se refiere a características de una planta que pasan reproduciblemente de una generación a la siguiente generación de plantas endogámicas de la misma variedad.

55 Captación. La captación se refiere a la translocación de una partícula, tal como una nanopartícula, por ejemplo oro o puntos cuánticos, a través de una pared celular o una membrana celular, en donde la translocación no se produce únicamente como resultado del impulso comunicado a la partícula por algo distinto de la célula en la que está siendo captada la partícula. Ejemplos no limitantes de dispositivos o métodos que causan translocación de una partícula a

través de una pared celular o una membrana celular únicamente como resultado del impulso comunicado a la partícula son las tecnologías de biolística, cañón génico, microinyección y/o impalefección.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para introducir una molécula de interés en una célula vegetal que tiene pared celular, cuyo método comprende:

- 5 i) subcultivar un cultivo en suspensión vegetal de una semana de antigüedad que comprende una célula vegetal que tiene pared celular en un medio de cultivo reciente que contiene una cantidad eficaz de un inhibidor de microtubulina durante 4 a 7 días, con lo que se produce un subcultivo vegetal que comprende la célula vegetal que tiene una pared celular;
- ii) revestir una nanopartícula que tiene un diámetro menor que 100 nm con una molécula de interés;
- 10 iii) poner el subcultivo vegetal y la nanopartícula recubierta en contacto entre sí; y
- iv) incubar conjuntamente el subcultivo vegetal y la nanopartícula revestida durante al menos 20 minutos, para permitir la captación de la nanopartícula y la molécula de interés en la célula vegetal que comprende una pared celular.

15 En aspectos particulares de la invención, la nanopartícula puede ser cualquier nanopartícula y puede, reversible o irreversiblemente, contener, revestirse con, o unirse por otros medios a, y/o ser portadora de, una molécula de interés. En ciertas realizaciones, puede introducirse una molécula de interés en las nanopartículas antes del contacto con una célula vegetal que tiene pared celular o al mismo tiempo que se introduce la nanopartícula en una célula vegetal que tiene pared celular. Ejemplos de nanopartículas que se pueden usar en realizaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellas, oro, puntos cuánticos, nanopartículas bañadas en oro, 20 nanopartículas porosas, nanopartículas mesoporosas, nanopartículas de sílice, nanopartículas de polímeros, nanopartículas de tungsteno, nanopartículas de gelatina, nanocápsulas, nanonúcleos, nanoesferas, nanovarillas, nanopartículas magnéticas, y/o combinaciones de ellas.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, una célula vegetal que tiene pared celular puede ser cualquier célula vegetal que comprende una pared celular entera e intacta. Ejemplos de células que tienen pared 25 celular incluyen, pero sin limitarse a ellas, células de algas, tabaco, zanahoria, maíz, canola, colza, algodón, palma, cacahuete, soja, caña de azúcar, *Oryza sp.*, *Arabidopsis sp.*, y *Ricinus sp.*, preferiblemente tabaco, zanahoria, maíz, algodón, canola, soja y caña de azúcar; más preferiblemente tabaco y zanahoria. Las realizaciones de la invención pueden incluir células que comprenden una pared celular de cualquier tejido o en cualquier lugar donde se encuentran, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, embriones, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, 30 raíces, puntas de las raíces, flores, semillas, vainas, tallos y cultivo de tejidos.

En realizaciones de la invención, una molécula de interés puede ser cualquier molécula que se puede suministrar a una célula vegetal de acuerdo con la presente invención. Las moléculas de interés, o los componentes de moléculas de interés, pueden comprender, pero sin limitarse a ellos, ácidos nucleicos, moléculas de ADN, ARN, ARNi, genes, plásmidos, cósmidos, YACs, BACs, polipéptidos, enzimas, hormonas, glico-péptidos, azúcares, grasas, péptidos 35 señal, anticuerpos, vitaminas, mensajeros, segundos mensajeros, aminoácidos, cAMP, fármacos, herbicidas, fungicidas, antibióticos y/o combinaciones de los mismos.

La invención puede ser útil para la prevención o el tratamiento de enfermedades. Realizaciones ilustrativas no limitantes incluyen el suministro de fungicidas, antibióticos, y/u otros fármacos a células que lo necesitan utilizando los métodos de la presente invención.

40 En realizaciones particulares de la invención, la superficie de la nanopartícula se puede funcionalizar, lo que puede permitir, por ejemplo, la captación específica o la unión reversible o irreversible de otras sustancias a la superficie de la nanopartícula. Como ejemplo no limitante, la superficie de una nanopartícula (por ej., nanopartículas de oro o puntos cuánticos) puede funcionalizarse con una monocapa auto-ensamblada de, por ejemplo, alcanotiolatos, que pueden funcionalizarse de nuevo o modificarse de otro modo. En un ejemplo no limitante adicional, la superficie de una nanopartícula puede modificarse con enlazadores que ya de por sí pueden estar adicionalmente funcionalizados o modificados. En una realización, una partícula puede ser PEGilada. En otras realizaciones, la nanopartícula puede comprender, o puede funcionalizarse con, uno o más de un núcleo (activo o inactivo), un revestimiento estérico (activo o inerte), un enlace escindible, y/o una molécula específica o ligando.

50 En aspectos de la invención, la nanopartícula puede ser capturada por varias partes de las células. Ejemplos de lugares en los que una nanopartícula puede ser capturada incluyen, pero sin limitarse a ellos, citosol, núcleo, tonoplastos, plástidos, etioplastos, cromoplastos, leucoplastos, elaioplastos, proteinoplastos, amiloplastos, cloroplastos y el lumen de una membrana doble. En otras realizaciones de la invención, la captación de nanopartículas en una célula que comprende una pared celular puede ocurrir mediante la ruta simplástica o apoplástica.

55 La invención se puede usar para generar células vegetales modificadas genéticamente, en donde las células vegetales tienen uno o más ácidos nucleicos introducidos en ellas mediante los métodos de la presente invención.

En un ejemplo de una realización, por medio de la nanopartícula de la presente invención se puede introducir un plásmido que comprende un gen de interés y un marcador seleccionable dentro de una célula vegetal que tiene una pared celular. En realizaciones adicionales, se pueden seleccionar transformantes estables que tienen el gen de interés y/o el marcador seleccionable establemente integrados. En realizaciones alternativas, una célula que ahora comprende el gen de interés se puede propagar para producir otras células que comprenden una molécula de interés. Las células vegetales que ahora comprenden una molécula de interés pueden ser una célula regenerable que se puede usar para regenerar una planta completa que incluye la molécula de interés.

La presente invención se puede usar para crear células vegetales regenerables que comprenden una molécula de interés para uso en cultivo de tejidos. Preferiblemente, el cultivo de tejidos será capaz de regenerar plantas que tienen sustancialmente el mismo genotipo que las células regenerables. Las células regenerables en estos cultivos de tejidos pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, flores, semillas, vainas o tallos.

La presente invención se puede usar para introducir un rasgo deseado en una célula vegetal que tiene una pared celular, en donde una molécula de interés es capaz de proporcionar el rasgo deseado a la célula vegetal. Ejemplos de rasgos deseados incluyen, pero sin limitarse a ellos, los rasgos seleccionados de esterilidad masculina, resistencia a herbicidas, resistencia a insectos y resistencia a enfermedades bacterianas, enfermedades fúngicas y/o enfermedades virales.

Otros aspectos de la invención proporcionan los métodos para generar líneas vegetales estabilizadas que comprenden un rasgo deseado o molécula de interés, en donde el rasgo deseado o molécula de interés puede introducirse por primera vez mediante captación de una nanopartícula a través de una pared de la célula vegetal. Los métodos para generar líneas vegetales estabilizadas son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir técnicas tales como, pero sin limitarse a ellas, autofecundación, retrocruzamientos, producción de híbridos, cruces entre poblaciones, y similares. Ventajosamente, las células vegetales que comprenden un rasgo deseado o molécula de interés introducido por primera vez en la planta o la célula (o sus predecesores) por captación de una nanopartícula a través de una pared celular se pueden usar en cruces con otras células vegetales diferentes para producir una primera generación (F1) de células híbridas, semillas y/o plantas con características superiores.

En realizaciones donde la molécula de interés comprende uno o más genes, el o los genes pueden ser un alelo dominante o recesivo. A modo de ejemplo, el o los genes conferirán rasgos tales como resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades bacterianas, resistencia a enfermedades fúngicas, resistencia a enfermedades virales, fertilidad masculina, esterilidad masculina, aumento de la calidad nutricional, y uso industrial.

Con el advenimiento de técnicas de biología molecular que han permitido el aislamiento y la caracterización de genes que codifican productos específicos de tipo proteína o ARN (por ejemplo, RNAi), los biólogos especializados en botánica han desarrollado un fuerte interés en manipular el genoma de células que contienen y expresan genes foráneos, o versiones adicionales o modificadas de genes nativos o endógenos (tal vez impulsados por diferentes promotores) con el fin de alterar los rasgos de una célula de manera específica. Dichos genes foráneos adicionales y/o modificados se denominan aquí colectivamente "transgenes". Durante los últimos quince a veinte años, se han desarrollado varios métodos para producir células transgénicas y, en realizaciones particulares, la presente invención se refiere a métodos para su producción introduciendo en una célula que tiene una pared celular un transgen mediante captación de una nanopartícula a través de una pared celular como se describe aquí. En realizaciones de la invención, el transgen puede estar contenido en un vector de expresión.

La transformación de la célula puede implicar la construcción de un vector de expresión que funcionará en una célula particular. Dicho vector puede comprender ADN que incluye un gen bajo control de, o unido operativamente a, un elemento regulador (por ejemplo, un promotor). El vector de expresión puede contener una o más de estas combinaciones de genes/elemento regulador operativamente unidos. El o los vectores pueden estar en forma de un plásmido y se pueden usar en solitario o en combinación con otros plásmidos para proporcionar células transformadas usando métodos de transformación como se describen aquí para incorporar transgenes en el material genético de una célula vegetal que comprende una pared celular.

Vectores de expresión para captación a través de nanopartículas: Genes marcadores

Los vectores de expresión pueden incluir al menos un marcador genético, operativamente unido a un elemento regulador (un promotor, por ejemplo) que permite que las células transformadas que contienen el marcador sean recuperadas, ya sea por selección negativa (es decir, inhibiendo el crecimiento de las células que no contienen el gen marcador seleccionable) o por selección positiva (es decir, cribado del producto codificado por el marcador genético). Muchos genes marcadores seleccionables para transformación son bien conocidos en las técnicas de transformación e incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas que destoxifican netabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida, o genes que codifican una diana alterada que puede ser insensible al inhibidor. También se conocen en la técnica algunos métodos de selección positiva.

Un gen marcador seleccionable comúnmente usado, adecuado para la transformación de plantas, puede incluir el gen de neomicina fosfotransferasa II (npt11) bajo el control de las señales reguladoras de la planta, lo que confiere

resistencia a canamicina. Véase, por ej., Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4803 (1983). Otro gen marcador seleccionable comúnmente usado puede ser el gen de higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Véase, por ej, Vanden Elzen et al., Plant Mol. Biol., 5:299 (1985).

5 Otros genes marcadores seleccionables de origen bacteriano que confieren resistencia a antibióticos incluyen los genes de gentamicina acetil transferasa, estreptomycin fosfotransferasa, aminoglicosido-3'-adenil transferasa, y el determinante de resistencia a bleomicina. Véase Hayford et al., Plant Physiol. 86:1216 (1988), Jones et al., Mol. Gen. Genet., 210:86 (1987), Svab et al., Plant Mol. Biol. 14:197 (1990), Hille et al., Plant Mol. Biol. 7:171 (1986). Otros genes marcadores seleccionables confieren resistencia a herbicidas tales como glifosato, glufosinato o bromoxinilo. Véase Comai et al., Nature 317:741-744 (1985), Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2:603-618 (1990) y
10 Stalker et al., Science 242:419-423 (1988).

Otros genes marcadores seleccionables adecuados para la transformación de plantas no son de origen bacteriano. Estos genes incluyen, por ejemplo, los genes de dihidrofolato reductasa de ratón, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa y acetolacetato sintasa de plantas. Véase Eichholtz et al., Somatic Cell Mol. Genet. 13:67 (1987), Shah et al., Science 233:478 (1986), Charest et al., Plant Cell Rep. 8:643 (1990).

15 Otra clase de genes marcadores adecuados para la transformación de plantas requiere el cribado de células de plantas presuntamente transformadas en vez de la selección genética directa de células transformadas para conferir resistencia a una sustancia tóxica, tal como un antibiótico. Estos genes son particularmente útiles para cuantificar o visualizar el patrón espacial de expresión de un gen en tejidos específicos y suelen denominarse genes indicadores, ya que pueden fusionarse con un gen o secuencia reguladora de genes para la investigación de la expresión génica.
20 Los genes usados corrientemente para cribar células transformadas incluyen los genes de β -glucuronidasa (GUS), β -galactosidasa, luciferasa y cloramfenicol acetiltransferasa. Véase Jefferson, R. A., Plant Mol. Biol. Rep. 5:387 (1987), Teeri et al., EMBO J. 8:343 (1989), Koncz et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 84:131 (1987), DeBlock et al., EMBO J. 3:1681 (1984).

25 Recientemente, se han facilitado unos métodos *in vivo* para visualizar la actividad GUS que no requieren la destrucción del tejido de la planta. Molecular Probes publication 2908, Imagen Green.TM., p. 1-4(1993) y Naleway et al., J. Cell Biol. 115:151a (1991). Sin embargo, estos métodos *in vivo* para visualizar la actividad GUS no han resultado útiles para la recuperación de células transformadas debido a la baja sensibilidad, fondos altamente fluorescentes, y limitaciones asociadas con el uso de genes de luciferasa como marcadores seleccionables.

30 Más recientemente, se han usado genes que codifican proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP, EGFP, EBFP, ECFP, y YFP) como marcadores para la expresión génica en células procarióticas y eucarióticas. Véase Chalfie et al., Science 263:802 (1994). Las proteínas fluorescentes y las mutaciones de proteínas fluorescentes se pueden usar como marcadores cribables.

Vectores de expresión para captación a través de nanopartículas: Promotores

35 Los genes incluidos en vectores de expresión deben ser impulsados por una secuencia de nucleótidos que comprende un elemento regulador, por ejemplo, un promotor. Ahora son bien conocidos varios tipos de promotores en las técnicas de transformación, como lo son otros elementos reguladores que se pueden usar en solitario o en combinación con promotores.

40 Tal como se usa aquí, "promotor" incluye la referencia a una región de ADN que puede estar secuencia arriba del inicio de la transcripción y que puede estar implicada en el reconocimiento y la unión de ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor vegetal" puede ser un promotor capaz de iniciar la transcripción en las células vegetales. Ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción preferentemente en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos del xilema, traqueidas, o esclerénquima. Tales promotores se conocen como "preferidos para el tejido". Los promotores que inician la transcripción sólo en ciertos tejidos se denominan "específicos del tejido". Un promotor específico para un
45 "tipo de célula" principalmente conduce la expresión en ciertos tipos de células de uno o más órganos, por ejemplo, células vasculares de raíces u hojas. Un promotor "inducible" puede ser un promotor que puede estar bajo control ambiental. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden efectuar la transcripción por promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias o la presencia de luz. Los promotores específicos del tejido, específicos del tipo celular e inducibles constituyen la clase de promotores "no constituyentes". Un promotor "constituyente" puede ser
50 un promotor que puede ser activo en casi todas las condiciones ambientales.

A. Promotores Inducibles

Un promotor inducible puede estar operativamente unido a un gen para su expresión en una célula- Opcionalmente, el promotor inducible puede estar operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal que puede estar operativamente unida a un gen para su expresión en una célula. Con un promotor inducible,
55 la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor.

En la presente invención se puede usar cualquier promotor inducible. Véase Ward et al., Plant Mol. Biol. 22:361-366 (1993). Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitarse a ellos: los del sistema ACEI que responde al

cobre (Mett et al., PNAS 90:4567-4571 (1993)); el gen *In2* del maíz que responde a "antídotos" (*safeners*) de herbicidas del tipo bencenosulfonamida (Hershey et al., Mol. Gen. Genetics 227:229-237 (1991) y Gatz et al., Mol. Gen. Genetics 243:32-38 (1994)); y el represor Tet de *Tn10* (Gatz et al., Mol. Gen. Genetics 227:229-237 (1991)). Un promotor inducible particularmente útil puede ser un promotor que responde a un agente inductor al que las plantas no responden normalmente. Un promotor inducible ilustrativo puede ser el promotor inducible de un gen de una hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional puede ser inducida por una hormona glucocorticosteroide. Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:0421 (1991).

B. Promotores constituyentes

Un promotor constituyente puede estar operativamente unido a un gen para su expresión en una célula o un promotor constituyente puede estar operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal que puede estar operativamente unida a un gen para su expresión en una célula.

En la presente invención se pueden utilizar diversos promotores constituyentes. Ejemplos de promotores constituyentes incluyen, pero sin limitarse a ellos: promotores de virus de plantas, tales como el promotor 35S de CaMV (Odell et al., Nature 313:810-812 (1985)); promotores de genes de actina de arroz (McElroy et al., Plant Cell 2:163-171 (1990)); ubiquitina (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12:619-632 (1989) y Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689 (1992)); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588 (1991)); MAS (Velten et al., EMBO J. 3:2723-2730 (1984)); e histona H3 de maíz (Lepetit et al., Mol. Gen. Genetics 231:276-285 (1992) y Atanassova et al., Plant Journal 2 (3): 291-300 (1992)). El promotor ALS, fragmento *XbaI/NcoI* 5' del gen estructural ALS3 de *Brassica napus* (o una secuencia de nucleótidos similar a dicho fragmento *XbaI/NcoI*), representa un promotor constituyente particularmente útil. Véase la solicitud PCT WO 96/30530.

C. Promotores específicos de un tejido o preferidos para un tejido

Un promotor específico de un tejido puede estar operativamente unido a un gen para su expresión en una célula. Opcionalmente, el promotor específico de un tejido puede estar operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal que puede estar operativamente unida a un gen para su expresión en una célula. Las plantas transformadas con un gen de interés operativamente unido a un promotor específico de un tejido pueden producir el producto proteico del transgen exclusivamente, o preferentemente, en un tejido específico.

En la presente invención se puede utilizar cualquier promotor específico de un tejido o preferido para un tejido. Ejemplos de promotores específicos de un tejido o preferidos para un tejido incluyen, sin limitarse a ellos, un promotor preferido para la raíz, tal como el del gen de faseolina (Murai et al., Science 23:476-482 (1983) y Sengupta-Gopalan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3320-3324 (1985)); un promotor específico de las hojas e inducido por la luz tal como el de *cab* o *rubisco* (Simpson et al., EMBO J. 4(11):2723-2729 (1985) y Timko et al., Nature 318:579-582 (1985)); un promotor específico de las anteras tal como el de LAT52 (Twell et al., Mol. Gen. Genetics 217:240-245 (1989)); un promotor específico del polen tal como el de Zm13 (Guerrero et al., Mol. Gen. Genetics 244:161-168 (1993)) o un promotor preferido para las microsporas tal como el de *apg* (Twell et al., Sex. Plant Reprod. 6:217-224 (1993)).

El transporte de proteínas producidas por transgenes a un subcompartimento celular, tal como cloroplasto, vacuola, peroxisoma, glioxisoma, pared celular o mitocondria, o para su secreción en el apoplasto, se puede producir por medio de la unión operativa de la secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia señal con la región 5' y/o 3' de un gen que codifica la proteína de interés. Las secuencias de direccionamiento en el extremo 5' y/o 3' del gen estructural pueden determinar, durante la síntesis y el procesamiento de proteínas, cuando puede ser compartimentalizada la proteína codificada en última instancia. Alternativamente las proteínas dirigidas a un compartimento celular pueden unirse directamente a una nanopartícula para dirigir la nanopartícula revestida con la molécula de interés al compartimento subcelular deseado.

La presencia de una secuencia señal dirige un polipéptido a un orgánulo intracelular o compartimento subcelular, o bien para su secreción en el apoplasto. Muchas secuencias señal son conocidas en la técnica- Véase, p.ej. Becker et al, Plant Mol. Bio. 20:49 (1992), Close, P. S., Master's Thesis, Iowa State University (1993), Knox, C., et al., "Structure and Organization of Two Divergent Alpha-Amylase Genes from Barley", Plant Mol. Biol. 9:3-17 (1987), Lemer et al., Plant Physiol, 91:124-129 (1989), Fontes et al., Plant Cell 3:483-496 (1991), Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:834 (1991), Gould et al., J. Cell. Biol. 108:1657 (1989), Creissen et al., Plant J. 2:129 (1991), Calderon, et al., "A short amino acid sequence able to specify nuclear location", Cell 39:499-509 (1984), Steifel, et al., "Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation", Plant Cell 2:785-793 (1990).

Genes de proteínas foráneas y genes agronómicos

Con las plantas transgénicas, se puede producir una proteína foránea en cantidades comerciales. Así, las técnicas para la selección y propagación de plantas transformadas, que son bien conocidas en la técnica, producen una pluralidad de plantas transgénicas que se recogen de manera convencional, y después se puede extraer una proteína foránea de un tejido de interés o de biomasa total. La extracción de la proteína de la biomasa de la planta se puede efectuar por métodos conocidos que se describen, por ejemplo, en Honey y Orr, Anal. Biochem. 114:92-6

(1981).

Una planta transgénica proporcionada para la producción comercial de una proteína foránea puede ser una célula o una planta. En otros aspectos, la biomasa de interés puede estar formada por semillas. Para la cantidad relativamente pequeña de plantas transgénicas que presentan altos niveles de expresión, se puede generar un mapa genético principalmente por medio de análisis convencionales RFLP, PCR y SSR, que identifican la localización cromosómica aproximada de la molécula de ADN integrada. Hay ejemplos de metodologías para esto, en Glick y Thompson, "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" CRC Press, Boca Raton 269:284 (1993). La información cartográfica concerniente a la localización cromosómica puede ser útil para la protección mediante derechos de propiedad industrial de una planta transgénica susceptible. Si puede llevarse a cabo la propagación no autorizada y pueden hacerse cruzamientos con otro germoplasma, el mapa de la región de integración se puede comparar con mapas similares para las plantas sospechosas con el fin de determinar si estas últimas tienen un linaje común con la planta susceptible. Las comparaciones de los mapas implicarían hibridaciones, RFLP, PCR, SSR y secuenciación, siendo técnicas convencionales todas ellas.

Asimismo, los genes agronómicos se pueden expresar en células transformadas o sus descendientes. De modo más particular, las plantas se pueden modificar genéticamente mediante los métodos de la invención para expresar diversos fenotipos de interés agronómico. Ejemplos de genes que se pueden usar a este respecto incluyen, sin limitarse a ellos, los clasificados a continuación.

1. Genes que confieren resistencia a plagas o enfermedades y que codifican:

A) Genes de resistencia a enfermedades de las plantas. Las defensas de las plantas suelen activarse por interacción específica entre el producto de un gen de resistencia (R) a una enfermedad en la planta y el producto de un gen de avirulencia (Avr) correspondiente en el patógeno. Una variedad de plantas se puede transformar con genes de resistencia clonados para producir plantas que son resistentes a cepas patógenas. Véase, por ej, Jones et al., Science 266:789 (1994) (clonación del gen Cf-9 de tomate que confiere resistencia a *Cladosporium fulvum*); Martin et al., Science 262:1432 (1993) (el gen Pto de tomate que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* codifica una proteína quinasa); Mindrinos et al., Cell 78:1089 (1994) (el gen Arabidopsis RSP2 confiere resistencia a *Pseudomonas syringae*).

B) Un gen que confiere resistencia a una plaga, tal como el nematodo del quiste de la soja. Véase, p.ej. la solicitud PCT WO 96/30517; la solicitud PCT WO 93/19181.

C) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de la misma o un polipéptido sintético modelado sobre ella. Véase, por ej, Geiser et al., Gene 48:109 (1986), que describe la clonación y la secuencia de nucleótidos de un gen de Bt δ -endotoxina. Por otra parte, las moléculas de ADN que codifican genes de δ -endotoxinas se pueden obtener a partir de la American Type Culture Collection, Manassas, Va., por ejemplo, con los números de acceso ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

D) Una lectina. Véase, por ejemplo, la descripción de Van Damme et al., Plant Molec. Biol. 24:25 (1994), que describe las secuencias nucleotídicas de varios genes de lectinas que se unen a manosa en *Clivia miniata*.

E) Una proteína que se une a vitaminas, tal como avidina. Véase la solicitud PCT US93/06487. La solicitud describe el uso de avidina y homólogos de avidina como larvicidas contra plagas de insectos.

F) Un inhibidor enzimático, por ejemplo, un inhibidor de proteasa o proteinasa o un inhibidor de amilasa. Véase, por ej, Abe et al., J. Biol. Chem. 262:16793 (1987) (secuencia de nucleótidos del inhibidor de cisteína proteinasa del arroz), Huub et al., Plant Molec. Biol. 21:985 (1993) (secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica el inhibidor I de proteinasa de tabaco), Sumitani et al., Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243 (1993) (secuencia de nucleótidos del inhibidor de alfa-amilasa de *Streptomyces nitrosporeus*) y patente de EE.UU. nº 5,494,813 (Hepher y Atkinson, expedida Feb. 27, 1996).

G) Una hormona o feromona específica de insectos tal como un ecdisteroide u hormona juvenil, una variante de la misma, un mimético basado en la misma, o un antagonista o agonista de la misma. Véase, por ejemplo, la descripción de Hammock et al., Nature 344:458 (1990), sobre la expresión en baculovirus de la hormona esterasa juvenil clonada, un activador de la hormona juvenil.

H) Un péptido o neuropeptido específico de insectos que, al expresarse, altera la fisiología de la plaga afectada. Por ejemplo, véanse las descripciones de Regan, J. Biol. Chem. 269:9 (1994) (la clonación con vectores de expresión produce ADN que codifica el receptor de la hormona diurética de insectos), y Pratt et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (1989) (se puede identificar una alostatina en *Diploptera puntata*). Véase también la patente de EE.UU. nº 5,266,317 expedida a Tomalski et al., que describe genes que codifican neurotoxinas paralizantes, específicas de insectos.

I) Un veneno específico de insectos producido de forma natural por serpientes, avispas u otros organismos. Por ejemplo, véase Pang et al., Gene 116:165 (1992), por su descripción de la expresión heteróloga en plantas de un gen codificante de un péptido insectotóxico de escorpión.

- J) Una enzima responsable de la hiperacumulación de un monoterpeno, un sesquiterpeno, un esteroide, ácido hidroxámico, un derivado de fenilpropoide u otra molécula no proteica con actividad insecticida.
- K) Una enzima implicada en la modificación, incluida la modificación después de la traducción, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, una enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una cinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sea natural o sintética. Véase la solicitud PCT WO 93/02197 a nombre de Scott et al., que describe la secuencia de nucleótidos de un gen de callasa. Las moléculas de ADN que contienen secuencias codificantes de quitinasa se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la ATCC con los núms. de acceso 39637 y 67152. Véase también Kramer et al., *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23:691 (1993), que describen la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica quitinasa de gusano del tabaco, y Kawalleck et al., *Plant Molec. Biol.* 21:673 (1993), que proporcionan la secuencia de nucleótidos del gen de ubi4-2 poliubiquitina del perejil.
- L) Una molécula que estimula la transducción de señales. Por ejemplo, véase la descripción de Botella et al., *Plant Molec. Biol.* 24:757 (1994), de las secuencias de nucleótidos de clones de ADNc de calmodulina de judía mung, y Griess et al., *Plant Physiol.* 104:1467 (1994), que proporcionan la secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de calmodulina de maíz.
- M) Un péptido de momento hidrófobo. Véase la solicitud PCT WO 95/16776 (descripción de derivados peptídicos de Taquiplesina que inhiben los patógenos fúngicos de las plantas) y la solicitud PCT WO 95/18855 (que describe péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia a enfermedades).
- N) Una permeasa de membrana, un formador de canales o un bloqueante de canales. Por ejemplo, véase la descripción de Jaynes et al., *Plant Sci* 89:43 (1993), sobre la expresión heteróloga de un análogo de un péptido lítico conocido como cecropina- β que confiere resistencia a las plantas transgénicas de tabaco frente a *Pseudomonas solanacearum*.
- O) Una proteína invasora de virus o una toxina compleja derivada de la misma. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de la cápside vírica en células vegetales transformadas confiere resistencia a la infección viral y/o al desarrollo de la enfermedad efectuada por el virus del que se puede derivar el gen de la proteína de la cápside, así como por otros virus afines. Véase Beachy et al., *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451 (1990). En células vegetales transformadas, se ha conferido resistencia mediada por proteínas de la cápside vírica frente a virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del pepino, virus de la veta del tabaco, virus X de la patata, virus Y de la patata, virus del grabado del tabaco, virus del cascabeleo del tabaco y virus del mosaico del tabaco. *Id.*
- P) Un anticuerpo específico de insectos o una inmunotoxina derivada del mismo. Por lo tanto, un anticuerpo dirigido a una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Véase Taylor et al., Abstract #497, "Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgo, Escocia) (1994)" (inactivación enzimática en tabaco transgénico mediante la producción de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla).
- Q) Un anticuerpo específico de virus. Véase, por ejemplo, Tavloraki et al., *Nature* 366:469 (1993), que indica que las plantas transgénicas que expresan genes de anticuerpos recombinantes están protegidas del ataque de los virus.
- R) Una proteína limitante del desarrollo producida de forma natural por un patógeno o un parásito. Por ejemplo, las endo α -1,4-D-poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y el suministro de nutrientes a la planta por solubilización de homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular de la planta. Véase Lamb et al., *Bio/Technology* 10:1436 (1992). La clonación y la caracterización de un gen que codifica una proteína que inhibe endopoligalacturonasa puede estar descrita por Toubart et al., *Plant J.* 2:367 (1992).
- S) Una proteína limitante del desarrollo producida de forma natural por una planta. Por ejemplo, Logemann et al., *Bio/Technology* 10:305 (1992), han demostrado que las plantas transgénicas que expresan el gen inactivador de ribosomas en la cebada tienen una mayor resistencia a las enfermedades fúngicas.

2. Genes que confieren resistencia a un herbicida:

- A) Un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como una imidazolinona o una sulfonilurea. Ejemplos de genes en esta categoría que codifican la enzima ALS también conocida como AHAS, están descritos, por ejemplo, por Lee et al., *EMBO J.* 7:1241 (1988), y Miki et al., *Theor. Appl. Genet.* 80:449 (1990), respectivamente.
- B) Glifosato (resistencia conferida, por ej., por genes mutantes que codifican la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs) (mediante introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o varias formas de mutagénesis *in vivo* de genes EPSP nativos), genes que codifican aroA y genes que codifican glifosato acetil transferasa (GAT) respectivamente), otros compuestos fosfonados tales como glufosinato (genes de la especie *Streptomyces* que codifican fosfinotricina acetil transferasa (PAT), incluyendo *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces*

viridichromogenes), y ácidos piridinoxi o fenoxi propiónicos y ciclohexonas (genes que codifican el inhibidor de ACCasae), véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4,940,835, Shah, et al. y Patente de EE.UU. 6,248,876, Barry et. al., que describen secuencias nucleotídicas de formas de EPSPs que pueden conferir resistencia a glifosato a una planta. Una molécula de ADN que codifica un gen *aroA* mutante se puede obtener con el número de registro ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del gen mutante está descrita en la Patente de EE.UU. nº. 4,769,061, Comai. La solicitud de patente europea nº 0 333 033, Kumada et al., y la patente de EE.UU. nº 4,975,374, Goodman et al., describen secuencias de nucleótidos de genes de glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-fosfotricina. La secuencia de nucleótidos de un gen PAT se proporciona en la solicitud de patente europea nº 0 242 246, Leemans et al. DeGreef et al., *Bio/Technology* 7:61 (1989), describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes bar quiméricos que codifican actividad PAT. Ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos fenoxi propionicos y ciclohexanonas, tales como setoxidim y haloxifop incluyen los genes Accl-S1, Accl-S2 y Accl-S3 descritos por Marshall et al., *Theor. Appl. Genet.* 83:435 (1992). Los genes GAT capaces de conferir resistencia a glifosato están descritos en WO 2005012515, Castle et. al. Los genes que confieren resistencia a herbicidas 2,4-D, fop y piridiloxi auxina están descritos en WO 2005107437, cedida a Dow AgroSciences LLC.

C) Un herbicida que inhibe la fotosíntesis, tal como una triazina (genes *psbA* y *gs+*) o un benzonitrilo (gen de nitrilasa). Przibila et al., *Plant Cell* 3:169 (1991), describen la transformación de *Chlamydomonas* con plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes. Las secuencias nucleotídicas para genes de nitrilasa están descritas en la patente de EE.UU. nº 4,810,648, Stalker, y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles bajo los núms. de registro ATCC 53435, 67441, y 67442. La clonación y la expresión de ADN que codifica una glutatión S-transferasa está descrita por Hayes et al., *Biochem. J.* 285:173 (1992).

3. Genes que confieren o contribuyen a una característica de valor añadido, tales como:

A) Metabolismo de ácidos grasos modificado, por ejemplo, por transformación de una planta con un gen antisentido de estearil-ACP desaturasa para incrementar el contenido de ácido nucleico de la planta. SeeKnultzon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2624 (1992).

B) Disminución del contenido de fitato--1) La introducción de un gen codificante de fitasa aumentaría la descomposición de fitato, añadiendo más fosfato libre a la planta transformada. Por ejemplo, véase Van Hartingsveldt et al., *Gene* 127:87 (1993), donde hay una descripción de la secuencia de nucleótidos de un gen de fitasa de *Aspergillus niger*. 2) Se podría introducir un gen que disminuyera el contenido de fitato. En el maíz, por ejemplo, esto se podría conseguir clonando y reintroduciendo después ADN asociado con el único alelo que puede ser responsable de mutantes de maíz caracterizados por tener bajos niveles de ácido fítico. Véase Raboy et al., *Maydica* 35:383 (1990).

C) Modificación de la composición de carbohidratos, efectuada, por ejemplo, por transformación de las plantas con un gen que codifica una enzima que altera el patrón de ramificación del almidón. Véase Shiroza et al., *J. Bacteriol.* 170:810 (1988) (secuencia de nucleótidos del gen de fructosil transferasa en mutantes de *Streptococcus*), Steinmetz et al., *Mol. Gen. Genet.* 20:220 (1985) (secuencia de nucleótidos del gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis*), Pen et al., *Bio/Technology* 10:292 (1992) (producción de plantas transgénicas que expresan α -amilasa de *Bacillus licheniformis*), Elliot et al., *Plant Molec. Biol.* 21:515 (1993) (secuencias de nucleótidos de genes de invertasa de tomate), Sogaard et al., *J. Biol. Chem.* 268:22480 (1993) (mutagénesis dirigida del gen de α -amilasa de cebada), y Fisher et al., *Plant Physiol.* 102:1045 (1993) (enzima II de ramificación de almidón de endospermo de maíz II).

Ejemplos

La presente invención se describe además en los siguientes ejemplos que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ningún modo.

Ejemplo 1

45 Preparación de material vegeta unicelular

Se usaron tanto células BY2 como células NT1. Las células BY2 son una línea celular de tabaco de rápido crecimiento, no verdes. Las células NT1 son células fotoautótrofas aisladas de tabaco. Tres o cuatro días antes de la transformación, un cultivo en suspensión de una semana de antigüedad se subcultivó en medio nuevo por transferencia de 2 ml de cultivo de NT1 o BY2 en 40 ml de medios NT1B o LSBY2 que contenían DAS-PMT1-1 50 nM (un inhibidor de microtúbulos) y 0,5-0,1% (v/v) de DMSO en un matraz de 250-mL. Se recogieron células individuales cuatro o siete días después del tratamiento con el inhibidor de microtúbulos. Las células individuales BY2 usadas fueron procesadas a través de un citómetro de flujo Beckman para contar las células viables. Había 658.250 células viables/ml con un diámetro medio de 10,43 μm and y un volumen de 593,8 μm^3 . Como se puede ver en la figura 1, todas las células eran células individuales (el par de la figura 1 tiene bordes que solapan). Las células se examinaron usando un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) unido a un sistema de imagen confocal (cuadro A). El cuadro B muestra una vista al microscopio óptico de una sola célula de tipo BY2 (cultivos habituales y mantenidos en medio EP12%) que se tiñeron con I2KI para resaltar el plástido (amiloplasto). Como se puede ver, las células individuales de la variante BY2 comprenden grandes cantidades de plástidos (amiloplastos)

distribuidos por todo el citoplasma de la célula.

La figura 2, cuadro A, representa la imagen en microscopio óptico de células fotoautotróficas de tabaco (NT1) que tienen cloroplastos prominentes, mantenidas en medio mínimo y 5% de dióxido de carbono. Estas células se subcultivaron una vez cada 14 días transfiriendo 1 ml de suspensión a $3,0OD^{600}$. La figura 2, cuadro B, muestra células NT1 similares visualizadas bajo un microscopio de fluorescencia en el que se puede ver que los cloroplastos activos autofluorescen en rojo.

Los tipos de células descritos anteriormente se usaron como células diana para la transformación. Las células verdes (células NT1) son un tipo óptimo de célula para rastrear una nanopartícula en el cloroplasto ya que tienen pocas células en una agrupación dada y son hialinas. Además, las células tienen cloroplastos muy prominentes que autofluorescen en rojo (como se puede ver en la figura 2, cuadro B).

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas y tratamiento de células

Para determinar si las células captan tinte fluorescente en cultivo, se usaron células individuales y cultivo en suspensión de agregado pluricelular típico de células BY2. Los cultivos de células en suspensión se expusieron a fluoresceína SAMSA (5-((2-(y -3)-S-(acetilmercapto) succinoyl)amino) fluoresceína) de Molecular Probes en ausencia de nanopartículas durante 20 minutos y después se lavaron brevemente antes de observarlos al microscopio de fluorescencia.

Nanopartículas de oro (GNP) se revistieron con fluoresceína SAMSA siguiendo las directrices técnicas del producto (accesible a todo el mundo por internet en probes.invitrogen.com/media/pis/mp00685.pdf). Se preparó un conjugado de oro-fluoresceína usando un método como el que se describe más adelante. Se disolvió 1 mg de fluoresceína SAMSA en 100 μ l de NaOH 0,1 M y se centrifugó durante 15 minutos para separar el grupo acetilo protector del tiol. Esta SAMSA activada se mezcló después con 100 μ l de coloides de oro de 150 nm (~ 109 partículas/ml). Después, la solución resultante se incubó durante 1 hora para garantizar el final de la reacción. Después se añadieron 50 μ l de HCl 1 M para neutralizar la solución. Se centrifugó a 3000 RPM durante 30 minutos y se separó el sobrenadante. El sedimento amarillo obtenido se resuspendió en 200 μ l de PBS 0,1 M, dando como resultado una solución de color anaranjado. Esta etapa de purificación se repitió 2 veces para asegurarse de la eliminación de fluoresceína SAMSA libre. El modo de unión de SAMSA a oro es principalmente a través de un enlace tiol. Debido a la repulsión electrostática significativa (SAMSA es dianiónico a $pH > 7$), se cree que SAMSA está perpendicular a la superficie de oro coloidal. Las partículas mostraron clara fluorescencia sin ningún fondo cuando se observaron bajo un microscopio DIC y un microscopio confocal multifotónico. Se transfirieron 20 y 40 μ l de nanopartículas de oro revestidas a 500 μ l de suspensiones de tabaco BY2/NT1 o células de tabaco fotoautótrofas y se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad.

Después de la incubación, 50 ml de alícuotas de las suspensiones de células se montaron en portaobjetos microscópicos de perfusión y se observaron bajo el microscopio para rastrear las partículas. Además, se prepararon alícuotas de las muestras para la observación microscópica 2-20 h después de los 20 minutos de incubación.

Ejemplo 3

Suministro de nanopartículas recubiertas con fluoresceína y acumulación en agregados de células BY2/NT1 y en el núcleo y los plástidos de las células individuales fotoautótrofas de tabaco.

Los agregados en suspensión de BY2/NT1 tratados con fluoresceína SAMSA en solitario y con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA se examinaron con baja y con alta resolución usando microscopios DIC, de campo brillante y de fluorescencia. La figura 3, cuadro A, muestra una imagen DIC de células tratadas con fluoresceína SAMSA en solitario mientras que la figura 3, cuadro B, muestra una imagen fluorescente de las mismas células. La figura 3, cuadro C, muestra una imagen DIC de células tratadas con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA, mientras que la figura 3, cuadro D, muestra la imagen fluorescente de las células tratadas con las GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA. Como se puede ver claramente en la figura 3, cuadro B, sólo las paredes celulares de las células tratadas con fluoresceína SAMSA en solitario se tiñeron con la fluoresceína y era visible muy poca de otra fluorescencia de fondo. Esto indica que las células no captaron la fluoresceína SAMSA en ausencia de nanopartículas.

En cambio, las GNPs revestidas con la fluoresceína SAMSA fueron rastreadas en las células y el núcleo (Nu), como se ve en la figura 3, cuadro D. Quedó claro en las observaciones DIC que las GNPs recubiertas con fluoresceína SAMSA se encuentran en todos los compartimentos de las células, excepto las vacuolas. Los filamentos citoplasmáticos que recubren las vacuolas también tenían GNPs recubiertas con fluoresceína SAMSA además del compartimento nuclear. El transporte de las nanopartículas a través de las paredes celulares no parece haber sido obstaculizado. Así, la acumulación de GNPs revestidos con fluoresceína SAMSA parece que está en el continuo simplástico en contraposición al apoplástico. El examen adicional de alta resolución de las células individuales tratadas con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA indicó la presencia de un gran número de GNPs en el nucleolo y parecía que las GNPs se acumulan preferentemente en estos orgánulos (figura 4: cuadro B). El cuadro A

de la figura 4 muestra una imagen de campo brillante del mismo núcleo mostrado en el cuadro B bajo un plano focal diferente.

5 La figura 5 muestra células fotoautótrofas tratadas con GNPs revestidas con fluoresceína SAMSA. El cuadro A muestra células muy hialinas en agrupaciones de 3-4 células con cloroplastos grandes que forran la cara interior de la pared celular. El cuadro B muestra la acumulación de nanopartículas en el cloroplasto. Los cuadros C y D muestran un aumento a más potencia de un solo cloroplasto usando un microscopio fluorescente. Las nanopartículas son visibles en la membrana tilacoidal del cloroplasto y están intercaladas entre los pigmentos clorofílicos autofluorescentes rojos.

10 Así, el rastreo de células fotoautótrofas vivas con los microscopios de fluorescencia y campo brillante a tiempo real demostró que las nanopartículas se acumulaban tanto en la membrana como en la matriz del cloroplasto. Las partículas también podían ser rastreadas en el lumen de la doble membrana del cloroplasto.

15 Si bien los experimentos hechos para rastrear las partículas dentro del cloroplasto revelaron que las partículas parecían acumularse en los plástidos, era difícil identificar visualmente la presencia de partículas dentro de la envuelta del cloroplasto usando microscopios ópticos, debido a que la resolución era insuficiente. Así, las partículas se rastrearon adicionalmente usando microscopios de reflectancia y fluorescencia, y las imágenes se fusionaron para localizar claramente la partícula, como se ve en la figura 6. El cuadro A de la figura 6 muestra una imagen reflectante donde se ven preferentemente GNPs. Este cuadro no sólo indica la presencia de partículas en el cloroplasto, sino que también muestra una densa acumulación de nanopartículas dentro del cloroplasto, indicando una captación activa. El cuadro B muestra partículas fluorescentes dentro del fondo de cloroplasto autofluorescente rojo. En el cuadro C se muestra una imagen fusionada de reflectancia y fluorescencia, donde las partículas fluorescentes amarillas están dentro de la frontera del cloroplasto, confirmando la presencia de la partícula en los plástidos.

Ejemplo 4

Suministro de GNPs unidas a ADN para transformación nuclear

25 Las GNPs revestidas con ADN se sintetizaron a través de 2 rutas, es decir, interacción no específica e interacción específica (usando PEG como plataforma) y se incubaron con células BY2/NT1. Para la interacción no específica, se añadieron 9 mL de manitol al 3% a 1 mL de suspensión de células y después se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Después se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 300 µl de manitol al 3%. A las células resuspendidas, se añadieron 50 µl de nanopartículas de oro de 150 nm de diámetro (obtenibles de BBI International (EM. GC150)) y 50 µg de ADN plasmídico (pDAB3831) (figura 16) (SEQ. ID. N° 1 y 2) que codifican YFP, y se dejó incubarla la mezcla durante 20 minutos. Después de la incubación, se añadieron 20 mL de manitol al 3% a la solución y la mezcla resultante se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Después se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo. Después, las células resuspendidas se transfirieron a micropocillos durante al menos 48 horas antes de la transferencia a placas de selección. Para la interacción específica (ruta PEG), se usó un gran exceso equivalente de ligando tiol: 100 monocapas/partícula, estimado suponiendo que la superficie ocupada por una sola molécula de tiol es aproximadamente 0,20 nm. Usando este cálculo, se añadieron 2 mg de SH-PEG(3)-OCH3 en la solución de GNPs citrato. La mezcla se agitó rápidamente a temperatura ambiente por espacio de 20 horas, durante las cuales el color de la solución se oscureció ligeramente. Después, se añadieron 3 volúmenes de THF a la mezcla de reacción y la solución resultante se centrifugó a 13 Krpm a 4° C durante 30 min. El sobrenadante se separó, el sedimento se redisolvió en 10 mL de agua ultrapura (18 MΩ.cm), se añadieron 30 mL de THF, y se llevó a cabo una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Después, el sedimento se disolvió en agua ultrapura (18 MΩ.cm) y se mantuvo a temperatura ambiente. Para aplicar el DNA plasmídico sobre H₃CO-PEG-SH-GNPs para los experimentos de transformación, se incubó 1 mg de ADN plasmídico con 10 mg de partículas de oro en 50 ml de agua durante 2 horas a 23°. (véase, Torney, F. et al., Nature Nanotechnol. 2, (2007)).

50 En la figura 7 se esboza una representación gráfica de un posible esquema de transformación. Para la transformación, se usó un ADN plasmídico, pDAB3831, que comprende un gen informador YPF. Las células BY2 se trataron como se ha descrito *supra* y las suspensiones se incubaron durante 48 a 72 h con agitación lenta en placas de micropocillos. Se tomó una alícuota de 50 µl de suspensión de los 0,5 - 1 ml totales de mezcla y se examinó al microscopio fluorescente para observar cualquier expresión del gen informador. Las células BY2 transformadas con el plásmido que contiene el gen informador YPF presentaron expresión transitoria del YFP.

Ejemplo 5

Suministro de puntos cuánticos PEGilados unidos a ADN para transformación nuclear

55 Funcionalización con PEG de los puntos cuánticos (QD, por sus siglas en inglés) para los estudios de evaluación de entrada en la célula: Este protocolo es una variación del protocolo de Dubertret B, et al., Science 298, 1759 (2002)). 2 mg de QDs de CdSe/ZnS revestidos con TOPO (óxido de tri-octil fosfina) (Ocean nanotechnology, Cat # QS00630-0010) se suspendieron con 0,015 g (5,5 µ mol) de PEG-PE (1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxipoli(etilenglicol)]) (Avanti lipids, Cat # 880160) en cloroformo y seguidamente la suspensión se sometió a

evaporación del disolvente y solubilización con agua. La conjugación con PEG se hizo para garantizar que hay protección completa frente a la citotoxicidad.

Conjugación de QDs a DNA plasmídico: Se suspendieron 2 mg de QDs revestidos con TOPO (óxido de tri-octil fosfina) (Ocean nanotechnology, Cat # QSO0630-0010) con 4 mg de HS-PEG-OCH₃ (Prochimia, Cat #TH 014-01) durante la noche a ≈60-70° C. El disolvente se eliminó en una estufa de vacío. Después, el residuo se suspendió en 1 mL de agua (18 M). La última etapa está acompañada de un cambio del residuo rojo a una solución transparente, ópticamente clara, anaranjada. Para revestir con ADN plasmídico los H₃CO-PEG-SH-QDs para los experimentos de transformación, se incubaron 0,02 mg de ADN plasmídico purificado (pDAB 3831) con el conjugado de QD resultante en 2 ml de agua durante 2 h a 23° en la oscuridad. (Torney, F. et al., Nature Nanotechnol. 2, (2007)).

- 5
- 10 Incubación de QDs con células intactas de tabaco: Los experimentos con líneas de células se realizaron usando líneas de células individuales de tabaco Bright Yellow (BY2), mantenidas a 25° C en medio LSBY2. Estas líneas de células individuales se producen por la misma metodología mencionada en IDM# 64901. Se añadió una concentración de 1-3 µL/mL a 500 µl de células en una placa de microtítulo de 24 pocillos, y se hicieron girar en un sacudidor suavemente durante 20 min antes de analizar las células.

15 Ejemplo 6

Transducción e interiorización celular de proteínas fluorescentes en células vegetales intactas por mediación de nanopartículas y aplicaciones potenciales

- 20 Los materiales para ensayar la transducción e interiorización celular de proteínas en células vegetales por mediación de nanopartículas incluyen coloides de oro de 150 nm de diámetro (BBI International, GC150), 5-((2-(y -3)-S (acetilmercapto)succinilo)amino)fluoresceína (fluoresceína SAMSA: Invitrogen, A-685), nanopartículas de coloides de oro revestidas con ácido carboxílico de 80 y 90 nm (TedPella, 32019), Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), EDC(1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida hidroclicloruro), (Pierce Biotecnology, 24510, 22980.), MES (ácido 2-[N-morfolino]etano sulfónico) (Fisher Scientific, AC32776-1000), paquetes de solución salina tamponada con fosfato (Sigma, P5368-10PAK), GFP marcada con histidina (Evrogen, Excitación max - 482 nm, Emisión max - 502 nm, FP611), turbo YFP (Evrogen, Excitación max - 525 nm, Emisión max - 538 nm, FP611), y yoduro de propidio (Sigma-P4864), diacetato de fluoresceína (Sigma, F7378).
- 25

- Cultivos de células (células individuales de tabaco BY2-E): Se usaron tanto células BY2 como células NT1. Las células BY2/NT1 son una línea celular de tabaco de rápido crecimiento, no verdes. Tres o cuatro días antes de los experimentos, un cultivo en suspensión de una semana de antigüedad se subcultivó en medio nuevo por transferencia de 2 ml de cultivo de NT1 o BY2 en 40 ml de medios NT1B o LSBY2 que contenían 1 µl de PMTI-1 propiedad de DAS (PMTI-1) (un inhibidor de microtúbulos) y 1-3% de glicerol, y 0,05-0,1% (v/v) de DMSO en un matraz de 250-mL. Se recogieron células individuales 3,5 o 7 días después del tratamiento con el inhibidor de microtúbulos. Las células individuales BY2 usadas fueron procesadas a través de un citómetro de flujo Beckman para contar las células viables. Hubo 658.250 células viables/ml con un diámetro medio de 10,43 µm (volumen de 593,8 µm³) - 50,42 µm (volumen de 67.079,05 µm³). Las células vivas en estos cultivos después del tratamiento PMTI-1, eran todas ellas células individuales. Las células se examinaron usando un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) unido a un sistema de imagen fluorescente .
- 30
- 35

Conjugados de nanopartículas: Se sintetizaron un conjugado de oro-fluoresceína, un conjugado de oro-GFP marcada con histidina, y un conjugado de oro-YFP.

- 40 Síntesis de conjugado de oro-fluoresceína: Se preparó un conjugado de oro-fluoresceína usando un método descrito previamente (Cannone, F., G. Chirico, et al. (2006), "Quenching and Blinking of Fluorescence of a Single Dye Molecule Bound to Gold Nanoparticles". J. Phys. Chem. B 110(33): 16491-16498.). Se disolvió 1 mg de fluoresceína SAMSA en 100 µl de NaOH 0,1 M y se centrifugó durante 15 minutos para separar el grupo acetilo protector del tiol. Esta SAMSA activada se mezcló con 100 µl de coloides de oro de 150 nm (~ 10⁹ partículas/ml). Después, esta solución se incubó durante 1 hora para garantizar el final de la reacción. Después de la incubación, se añadieron 50 µL de HCl 1 M para neutralizar la solución. Se centrifugó a 3000 RPM durante 30 minutos y se separó el sobrenadante. El sedimento amarillo obtenido se resuspendió en 200 µL de PBS 0,1 M, dando como resultado una solución de color anaranjado. Esta etapa de purificación se repitió 2 veces para asegurarse de la eliminación de fluoresceína SAMSA libre. El modo de unión de SAMSA a oro es principalmente a través de un enlace tiol. Debido a la repulsión electrostática significativa (SAMSA es dianiónico a pH>7), se cree que SAMSA está perpendicular a la superficie de oro coloidal (Cannone et. al. 2006).
- 45
- 50

- Síntesis de conjugados de oro-GFP marcada con histidina y oro-YFP: Los conjugados de oro con proteínas se sintetizaron usando una ligera modificación del protocolo descrito por Grabarek (Grabarek, Z. y J. Gergely (1990), "Zero-length cross linking procedure with the use of active esters". Analytical Biochemistry 185(1): 131-135)), que se ilustró para el acoplamiento secuencial de dos proteínas. 0,25 ml de solución coloidal de oro revestido con ácido carboxílico de 90 nm (~10⁹ partículas/ml) se centrifugó a 3000 RPM durante 10 minutos. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento rojo se suspendió en 1 ml de tampón de activación (MES 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 6,0). A esta solución se añadieron 0,4 mg de EDC y se añadieron 1,1 mg de sulfo-NHS a esta solución y se centrifugó
- 55

durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 9 µl de proteína (GFP marcada con histidina o YFP turbo) y la solución resultante se incubó durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente con el fin de que la proteína y el oro reaccionaran completamente. La proporción de coloides de oro y proteína usados en esta reacción se determinó calculando el número de ácidos carboxílicos presentes en los coloides de oro. Primero se calculó el número de grupos carboxílicos presentes en un coloide de oro dividiendo la superficie de 1 partícula de oro (presuntamente una esfera) entre la superficie ocupada por un grupo carboxílico (0,20 nm² Kimura, K.; Takashima, S.; Ohshima, H. Journal of Physical Chemistry B 2002, 106, 7260-7266). Este resultado se multiplicó por el número total de coloides de oro para obtener el número total de grupos carboxílicos presentes en la solución coloidal de oro completa. Esta cantidad se igualó al número de grupos amino presentes en una cantidad dada de proteína. Estos coloides de oro se unen a proteína vía la formación de un enlace amídico entre el ácido carboxílico presente sobre el oro y el grupo amino presente sobre la proteína (Grabarek, Z. y J. Gergely (1990). "Zero-length cross linking procedure with the use of active esters." Analytical Biochemistry 185(1): 131-135). Hay aproximadamente 127.285 moléculas de proteína ligadas a una nanopartícula de oro.

Tratamientos celulares - Se prepararon tres muestras separadas para el ensayo, como sigue:

15 *Curso temporal de la captación de oro y la viabilidad celular* - Se prepararon las siguientes muestras en placas estériles de 24 pocillos:

i) 500 µl de células BY2-E individuales (control);

ii) 500 µl de células BY2-E individuales + 20 µl de GNP + 25 µl de di-acetato de fluoresceína (FDA) + 25 µl de yoduro de propidio; y

20 iii) Otros tratamientos incluyen 40, 60, 80 µl de GNP con las células y tinciones de viabilidad celular como se ha mencionado más arriba. Las muestras tratadas (Ref) se examinaron al microscopio de fluorescencia a 5, 20, 120 min y finalmente después de 18-20 h.

Tratamientos de oro-fluoresceína SAMSA - Las muestras siguientes se prepararon en una placa estéril de 24 pocillos:

25 i) 500 µl de células BY2-E individuales (control);

ii) 500 µl de células BY2-E individuales + 20 µl de fluoresceína SAMSA (control); y

iii) 500 µl de células BY2-E individuales + 20 µl de Au-fluoresceína SAMSA.

Las células tratadas se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente antes de realizar los estudios microscópicos.

30 *Tratamientos de oro-GFP marcada con histidina* - Las muestras siguientes se prepararon en una placa estéril de 24 pocillos:

i) 500 µl de células BY2-E individuales (control).

ii) 500 µl de células BY2-E individuales + 10 µl de GFP marcada con histidina (control).

iii) 500 µl de células BY2-E individuales + 20 µl de Au-GFP marcada con histidina.

35 Las células tratadas se incubaron durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente antes de realizar los estudios microscópicos.

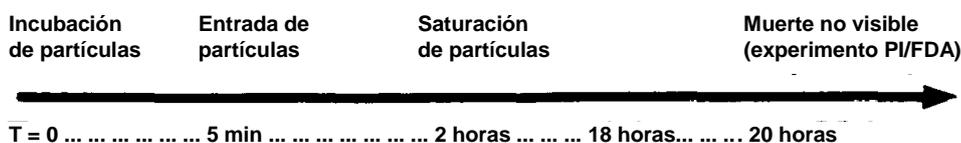
Microscopía: La microscopía de contraste de fases y fluorescencia de los experimentos con células individuales empleando Au-fluoresceína SAMSA y Au-GFP marcada con histidina se llevó a cabo usando un microscopio de fluorescencia invertido Leica (DAS). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 20 aumentos. Se utilizó un filtro FITC (isotiocianato de fluoresceína) y GFP para los tratamientos de células individuales con fluoresceína SAMSA y GFP respectivamente.

45 *Microscopía de contraste de imagen diferencial (DIC), confocal y de reflectancia*: Estos estudios se llevaron a cabo en el centro de microscopía de la UIUC (University of Illinois at Urbana Champaign) con un microscopio invertido Zeiss. Para todos estos métodos, la ampliación se mantuvo a 63X. Para el modo confocal, se usaron filtros FITC, GFP e YFP para tratamientos de células diferentes. Para estudios de reflectancia, el espejo dicróico se reemplazó por una lámina de vidrio transparente y se eliminó el filtro de emisión.

50 *Adquisición de la imagen*: Las imágenes de las células de tabaco cultivadas en suspensión se obtuvieron usando un microscopio Zeiss Axiovert M 200 equipado con un sistema de seccionamiento óptico de tipo apótomaco acoplado a un sistema de iluminación X-Cite 120 (Carl Zeiss microimaging, Oberkochen, Alemania). Se obtuvo la imagen de las partículas de oro en virtud de una configuración de formación de imágenes de reflectancia utilizando la iluminación de mercurio a través de un filtro de excitación 635/20 y la imagen se obtuvo utilizando un filtro de luz polarizada IGS

(disponible en 33001, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT) que consistía en un vidrio GG420 para bloquear los rayos UV, KG5 (bloqueante de IR), divisor de haz 50/50 y polarizadores paralelos de excitación y emisión. Simultáneamente, se obtuvieron imágenes de luz transmitida/DIC utilizando óptica DIC estándar y GFP en las partículas de oro revestidas con ADN-GFP (pseudocoloreada verde) con un filtro FITC de paso de banda (filtro de excitación HQ480/40, espejo dicróico Q505LP y emisión HQ535/50). Las células se distribuyeron en alícuotas en una disposición de cámaras de vidrio con tapa con un espesor de 500 micrómetros (Grace Bio-labs, Bend, OR) para obtener imágenes de alta resolución. La mayoría de las imágenes se tomaron con un objetivo Planapochromat 63x 1.4 NA 63x 1.4 NA o con un objetivo Planapochromat 40x 1.4 NA, dependiendo del tamaño de las células (disponible en Carl Zeiss Microimaging, Obercohen, Alemania). Los tiempos de exposición fueron ajustados para cada canal (es decir, DIC, Reflectancia y/o FITC) y fueron expuestos secuencialmente usando el programa Axiovision 4.6 acoplado a una cámara monocromática Axiocam MRm de alta resolución (disponible en Carl Zeiss, Obercohen, Alemania) con la dimensión de 1388x1034 pixeles. Cuando es necesario, la resolución se ajusta a 1024x1024 y a una secuencia de lapso de tiempo de imágenes obtenidas a la mayor velocidad posible para resolver la dinámica de las partículas durante un periodo de 2-5 min que consiste en alrededor de 150-250 fotogramas. Las imágenes se prepararon o bien en el módulo de galería Axiovision 4.6 o en Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

Curso temporal y estudios de interiorización de GNP: Para evaluar el impacto de la captación de partículas y concentración de de GNPs sobre la integridad y la viabilidad de las células, se hicieron experimentos de curso temporal sobre líneas de células individuales BY2-E incubadas con GNP funcionalizada con citrato (90 nm de diámetro). En este experimento, se usaron varias concentraciones de GNP (20, 40, 60, 80 µl). Las partículas fueron interiorizadas en el espacio de 5 minutos después de mezclar con células, mientras que la acumulación de partículas tardó hasta 2 h en mostrar niveles elevados en el citosol y el núcleo de las células. Dentro de la concentración ensayada, se observó un nivel más alto de viabilidad celular y vigor celular con tratamientos de 20 µl como fue estudiado por el protocolo FDA y PI (tinción de células vivas/muertas). En todas las muestras tratadas, la viabilidad media de las células fue cercana al 98%, pero con la concentración más alta ensayada, no se vio núcleo teñido en FDA en el tratamiento con 80 µl. Sin embargo, estos núcleos no teñidos no respondieron a PI, lo que indica que no hay muerte celular. Este resultado indica la concentración más alta de partículas que podía conducir a alteraciones internas en un grado tal que la célula puede estar quiescente pero todavía viva después de 20 h de tratamiento.



Estudios de rastreo con microscopio de reflectancia: Los estudios de reflectancia sobre células de tabaco BY2/NT1 individuales tratadas con conjugados de oro Proteína (GFP/YFP) muestran la presencia de nanopartículas de oro dentro de las células. Esto se comparó con células BY2 individuales control, sin tratar, que parecían ser oscuras en condiciones similares, como se muestra en la figura 8. Se observaron nanopartículas individuales de oro que emiten reflectancia brillante, como se muestra en la figura 8. Esto es una indicación clara de captación de nanopartículas de oro por estas células BY2 provistas de pared.

Experimentos con oro-fluoresceína SAMSA: Los experimentos de contraste de fases conducidos en DAS revelaron una tinción amarillo brillante del espacio intracelular y el núcleo para las células tratadas en comparación con el contraste de plata observado para células individuales. También, en muchas células, en condiciones de plasmátesis, la membrana plasmática se retiraba por sí sola de la pared celular, dejando un espacio entre ambas que indicaba la plasmátesis total o parcial de la célula, como se observa en la figura 9. Estas células, cuando se observan bajo experimentos de fluorescencia confocal de células individuales tratadas con fluoresceína SAMSA en solitario, presentaron fluorescencia en el citoplasma y el núcleo mientras que aparecían oscuras en las células control no tratadas. También, las células tratadas con tinte de fluoresceína SAMSA en solitario presentaban algo de fluorescencia en la pared, pero no en el interior de las células. Esto significa que la fluoresceína SAMSA no es interiorizada por las células mismas y que la nanoartícula de oro está actuando como vehículo para su captación.

Experimentos con oro-GFP marcada con histidina: Para establecer el suministro de proteínas a las células intactas a través de GNPs, se confirmó la unión de GFP a GNP usando microscopía de fluorescencia, como se muestra en la figura 10. Las imágenes de fluorescencia de células BY2 tratadas con GFP marcada con histidina presentan fluorescencia extracelular con células oscuras sin fluorescencia en el centro. Esto indica que en tratamientos control en los que se añade GFP marcada con histidina a las células sin partículas de oro, no se interiorizan las partículas. Las pruebas que demuestran la entrada de proteína dentro de las células fueron: i) aumento de la intensidad de fluorescencia de la fluorescencia en las células tratadas como internamente, ii) filamentos citoplasmáticos fluorescentes en células tratadas en comparación con filamentos oscuros en las células control (véase la figura 11). Se hicieron observaciones similares con GNPs unidas a YFP, lo que indica la clara interiorización de esta proteína fluorescente en las células vegetales con células intactas (véase la figura 12).

Hay un cierto nivel de reflectancia de fondo y autofluorescencia en las células individuales que son inherentes en plasmátesis/muerte o células que presentan unas características citológicas de tipo muerte celular programada

(PCD). Con el fin de delinear las células que han interiorizado la proteína a partir de estos problemas de fondo y para demostrar inequívocamente con una prueba directa la interiorización de la proteína, se llevó a cabo una investigación extensa al microscopio de reflectancia para enfocar y rastrear niveles de partículas individuales o de agregados de partículas. Los resultados de este estudio demuestran claramente la interiorización de partículas con proteína dentro de las células y del núcleo. Sin embargo, las células que acumularon mayor número de partículas con la proteína fluorescente tenían una tendencia a la plasmalísis cuando se observaron al microscopio. Es muy probable que el aumento de la concentración de proteína debido a la gran acumulación de GNPs unidos o bien a GFP o YFP alcance niveles tóxicos o que la observación prolongada al microscopio induzca ROS que a su vez tiene un efecto deletéreo en tales células.

10 Ejemplo 7

Análisis molecular y prueba de la integración genómica de transgenes en la progenie T1 de *Arabidopsis thaliana* cv *Columbia*

15 Se extrajo ADN genómico de plantas transgénicas de *Arabidopsis* a partir de material de hoja completa de 6 semanas de antigüedad usando un mini kit "DNeasy Plant" de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Inc). Se usaron los siguientes cebadores de PCR para YFP y PAT en las reacciones PCR que usaban el ADN genómico molde de las plántulas T1 que toleraban 4-5X pulverizaciones sobre el terreno del herbicida Finale.

YFP

Cebador directo: 5'-TGTTCCACGGCAAGATCCCCTACG-3' (SEQ. ID. N° 3)

Cebador inverso: 5'-TATTCATCTGGGTGTGATCGGCCA-3' (SEQ. ID. N° 4)

20 PAT

Cebador directo: 5'-GGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAG-3' (SEQ. ID. N° 5)

Cebador inverso: 5'-AGATCTGGGTAAGTGGCCTAACTG-3' (SEQ. ID. N° 6)

25 Los productos génicos de la PCR para PAT e YFP (Yellow Florescent tag, Evrogen) se amplificaron en un volumen total de reacción de 50 µl de la mezcla que contenía 100 ng de ADN molde genómico, 1x tampón de reacción ExTaq (TaKaRa Bio), dNTP 0,2 mM, 10 pmol de cada cebador, y 0,025 unidades/µL de ExTaq. Se usaron las siguientes condiciones para la PCR: 1 ciclo a 96°C durante 5 min y 31 ciclos del programa PCR siguiente: 94°C, 15 s; 65°C, 30 s; 72°C, 1 min y se hizo una extensión final a 72°C durante 7 min para completar la síntesis del producto. Las imágenes en gel se obtuvieron utilizando un sistema de obtención de imágenes Bio Rad Gel. (Figuras 13 y 14.) Los fragmentos amplificados se purificaron en gel usando un estuche de purificación (Qiagen Inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Los fragmentos PXCR se secuenciaron usando un cebador directo de PAT e IFP directo usando una tecnología de secuenciación Sanger avanzada (MWG Biotechnologies, Inc) y la secuencia se analizó usando el software Sequencher.

35 Los resultados indican que las secuencias de PAT e YFP se suministraron a través del suministro de ADN mediado por nanopartículas y puntos cuánticos, lo que proporciona una prueba evidente de la integración genómica estable de transgenes en el ADN genómico de las plantas T1.

Ejemplo 8

Suministro facilitado de QD a través de la pared celular de células individuales de tabaco JTNT1.

40 Varios péptidos fueron funcionalizados en la superficie en base al procedimiento discutido en el ejemplo 7 para ensayar el suministro no invasivo de los PC a través de la pared celular. La determinación de la unión Péptido que penetra en la célula (CPP)/unidad de transducción de proteína (PTD) se llevó a cabo vía electroforesis en gel como se describe más abajo.

45 La electroforesis en gel se llevó a cabo sobre conjugados péptido-QD para confirmar la unión de los péptidos a QDs. Las muestras usadas fueron QD-Amina (control), QD-Amina-R9, QD-Amina-Zein, QD-Amine-Pep1 y QD-Amina-MPG. R9, Zein, Pep1 y MPG son péptidos. Se desarrolló un gel de agarosa al 2% (p/v) a 120 V en tampón TBE (1X, pH 8) durante 1 hora. Los QD-Amina-péptidos migraron hacia el extremo negativo del electrodo lo que demostraba la unión de carácter fuertemente positivo de los péptidos unidos a QDs mientras que QD-Amina permanecían estáticos, lo que demostraba la carga débilmente positiva del grupo amino debido al efecto neutralizante del tampón de gel a un pH básico, como se muestra en la figura 15 (calle 1 : QD-Amina; 2 : QD Amina-R9; 3 : QD-Amina-T-Zein; 50 4: QD Amina-Pep1; 5: QD-Amina-MPG).

Los péptidos se ensayaron para interiorización en las células, y la emisión de QD dentro de la célula se usó como una medida para rastrear el nivel de interiorización de las partículas dentro de las células y sus compartimentos. Se

usaron células individuales JTNT1 con paredes intactas como células diana en estos experimentos. La Tabla 1 muestra los tratamientos de las muestras. Las células se rastrearon al microscopio.

5 La microscopía se llevó a cabo en el espacio de 1 minuto después de la preparación de la muestra al microscopio confocal de disco giratorio (Andor Technology Revolution System). El filtro de excitación se ajustó a 488 nm mientras que el filtro de emisión se ajustó más allá de 650 nm.

10 Como se muestra en la tabla 1, los protoplastos control y JTNT1 no presentaron autofluorescencia a la longitud de onda de emisión utilizada para los QDs. Se observó residuo significativo (trozos de células rotas) en cada una de estas muestras. Las muestras 4, 5, 6, y 7 no presentaron interiorización de QDs dentro de células individuales o de protoplastos. Las muestras 8 y 9 indicaron una clara presencia de QDs rodeando el núcleo tanto en células individuales provistas de pared como en protoplastos. Esto era debido a la presencia del péptido que penetra en la células en los QDs que tiene la señal de localización nuclear (NLS). Sin embargo, las muestras # 6 y 7 tenían γ -Zein unida a los QDs y no presentaban interiorización de QD en el interior de la célula. Esto indica que los QDs fueron captados en las células debido al Péptido de penetración celular (CPP) o a la unidad de transducción de proteína (PTD), γ -Zein ya que los QDs que estaban funcionalizados sólo con amino no tenían CPP/PTD interiorizadas.

15

Tabla 1

Tipo de funcionalización	Tipo de célula individual usado (100 μ l)	Volumen de QDs funcionalizados	Autofluorescencia a 480-650 nm	Localización de QDs en la célula
1 QD-PEG-Amina- Control-1	ND	20 μ L	No	ND
2 Protoplasto - Control-2	Protoplasto de Tabaco JTNT1	0 μ L	No	ND
3 Células individuales (Control-3)	Células individuales de Tabaco JTNT1 provistas de pared	0 μ L	No	ND
4 QD-PEG-Amina	Protoplasto de Tabaco JTNT1	20 μ L	No	No
5 QD-PEG-Amina	Células individuales de Tabaco JTNT1 provistas de pared	20 μ L	No	No
6 QD-PEG-Amina- Zein	Protoplasto de Tabaco JTNT1	20 μ L	No	No
7 QD-PEG-Amina- Zein	Células individuales de Tabaco JTNT1 provistas de pared	20 μ L	No	No
8 QD-Amina- γ -Zein	Protoplasto de Tabaco JTNT1	20 μ L	No	Sí
9 QD-Amina- γ -Zein	Células individuales de Tabaco JTNT1 provistas de pared	20 μ L	No	Sí

20 Estos datos demuestran la evidencia de la interiorización celular de puntos cuánticos unidos a CPP/PTD con la señal de localización nuclear (NLS) llevando los QDs a través de la pared celular de la célula funcional intacta mediante un microscopio confocal de disco giratorio (Andor Technology Revolution System). La localización nuclear de los QDs es posible a través de la pared celular en la muestra 9, y en ausencia de la pared celular como se ve la interiorización en la célula basada en el protoplasto que está desprovista de una pared celular mediante tratamiento enzimático. Así la simple presencia de la pared celular no obstaculiza la interiorización de puntos cuánticos, lo que evidencia que la entrada de partículas se demuestra de forma no invasiva con un CPP / DPT en las células con pared celular intacta.

REIVINDICACIONES

1. Un método para introducir una molécula de interés en una célula vegetal que tiene pared celular, que comprende:
- 5 i) sub-cultivar un cultivo en suspensión vegetal de una semana de antigüedad que comprende una célula vegetal que tiene pared celular en un medio de cultivo reciente que contiene una cantidad eficaz de un inhibidor de microtubulina durante 4 a 7 días, con lo que se produce un subcultivo vegetal que comprende la célula vegetal que tiene una pared celular;
 - ii) revestir una nanopartícula que tiene un diámetro menor que 100 nm con una molécula de interés;
 - iii) poner el subcultivo vegetal y la nanopartícula revestida en contacto entre sí; y
 - 10 iv) incubar conjuntamente el subcultivo vegetal y la nanopartícula revestida durante al menos 20 minutos, para permitir la captación de la nanopartícula y la molécula de interés en la célula vegetal que comprende una pared celular.
2. El método según la reivindicación 1, en donde revestir una nanopartícula con una molécula de interés comprende inmovilizar la molécula de interés a través de absorción no covalente sobre la superficie de la nanopartícula.
3. El método según la reivindicación 1, que comprende además absorber la molécula de interés en la nanopartícula.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la nanopartícula es una nanopartícula de oro.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de interés es una molécula de ácido nucleico o de fluoresceína.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además seleccionar la célula para la integración estable de la molécula de interés.

Figura 1

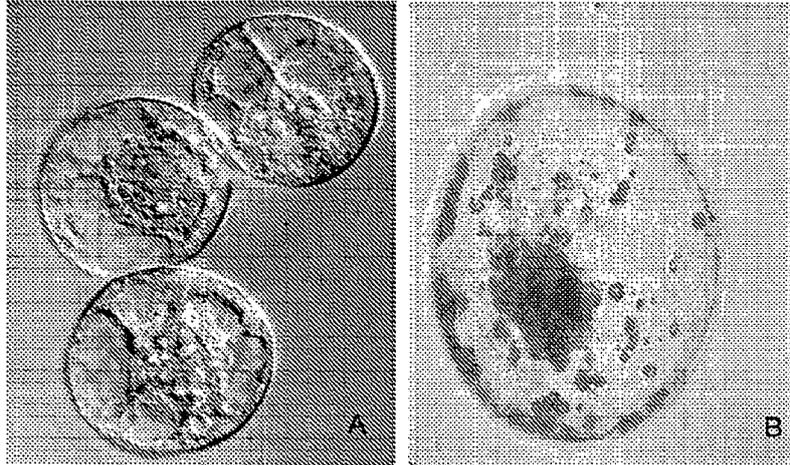


Figura 2

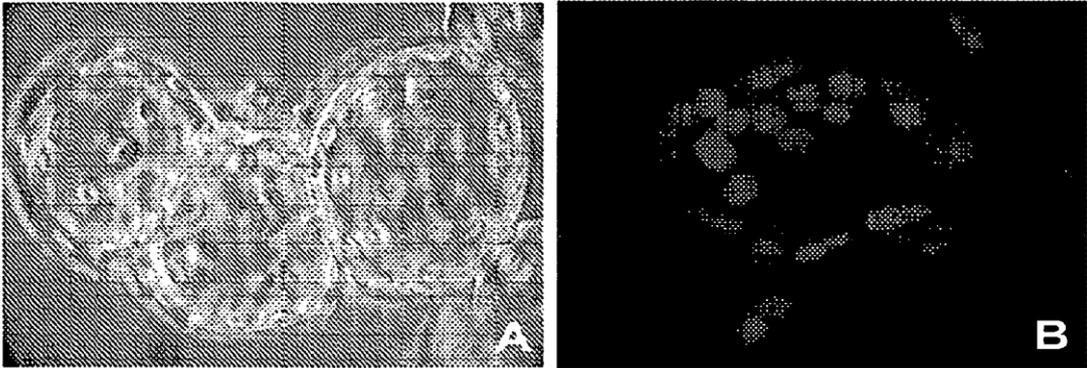


Figura 3

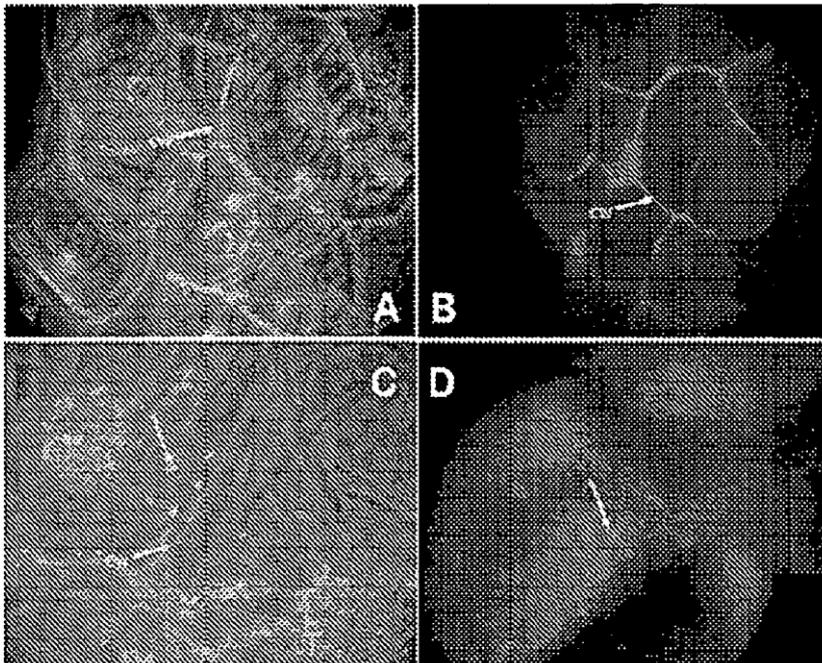


Figura 4

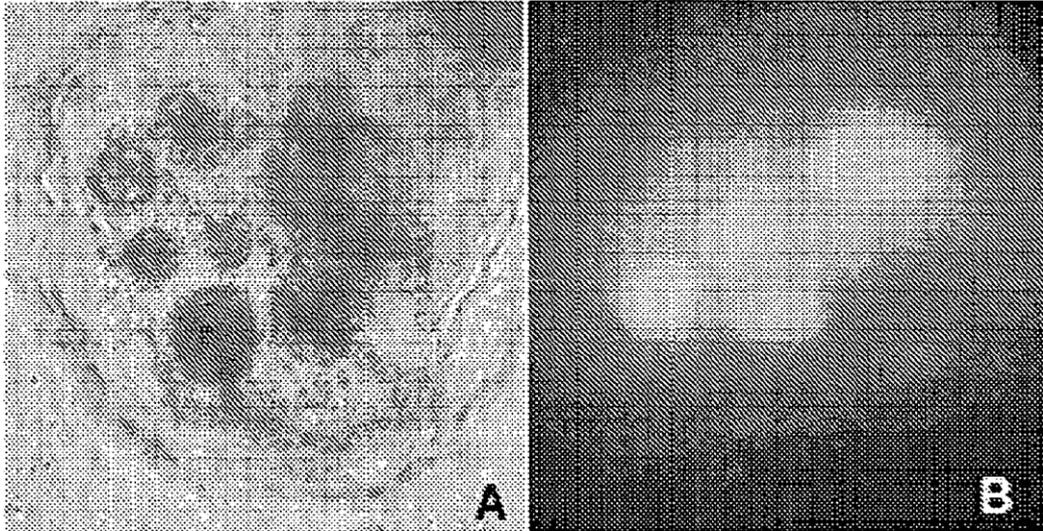


Figura 5

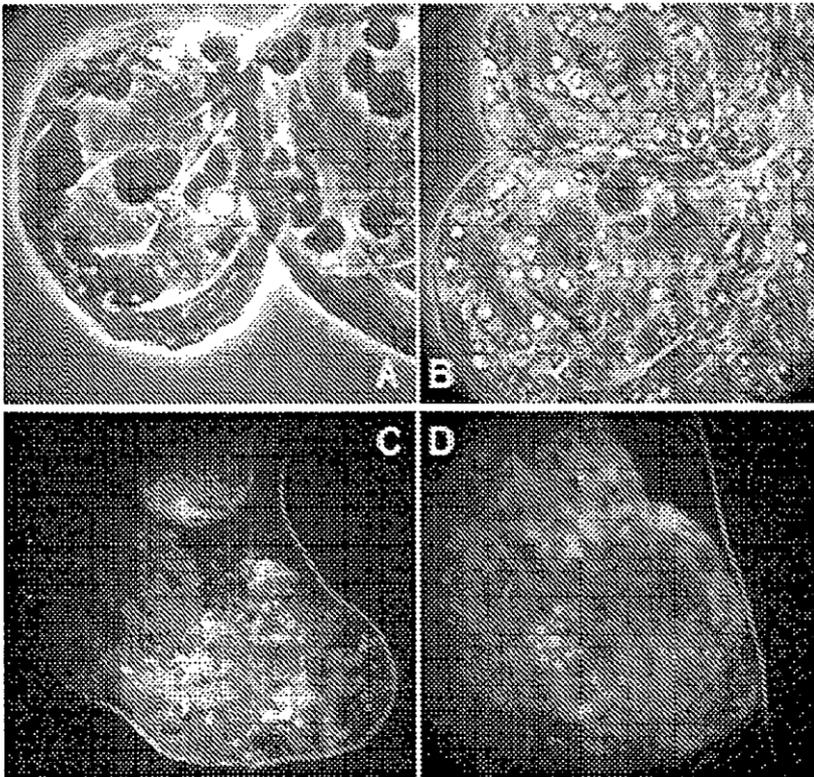


Figura 6

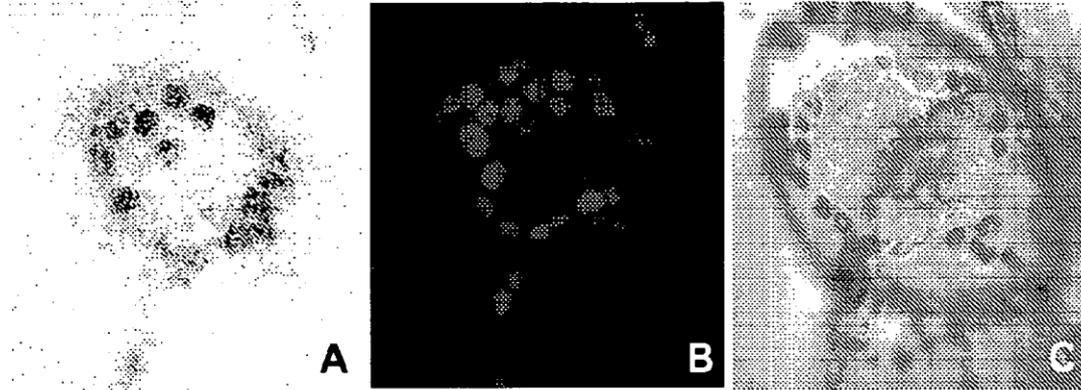


Figura 7

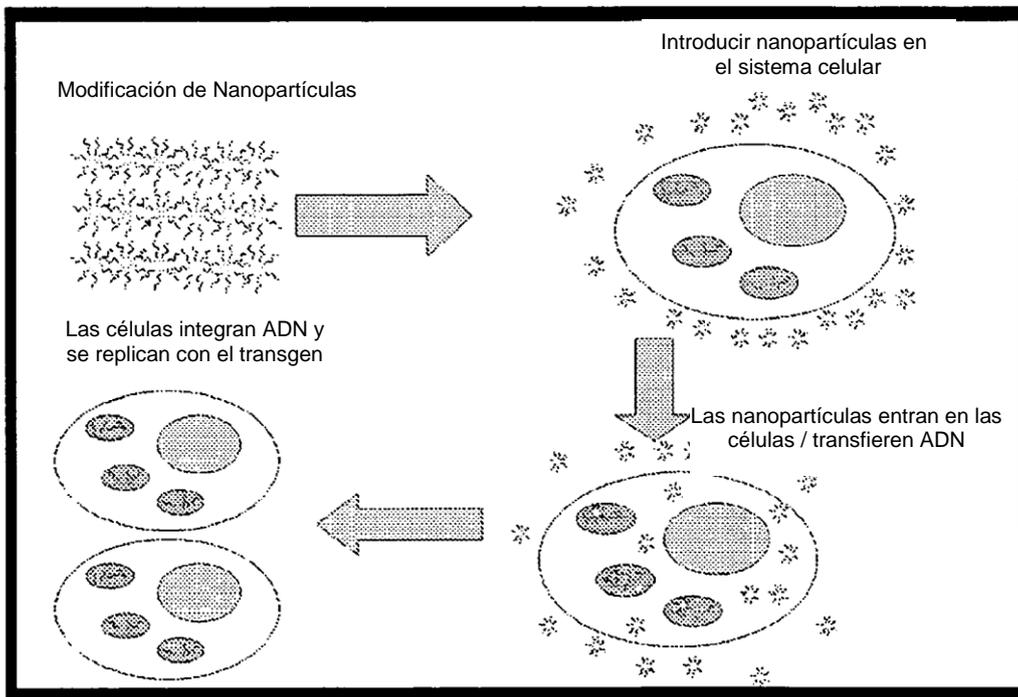


Figura 8

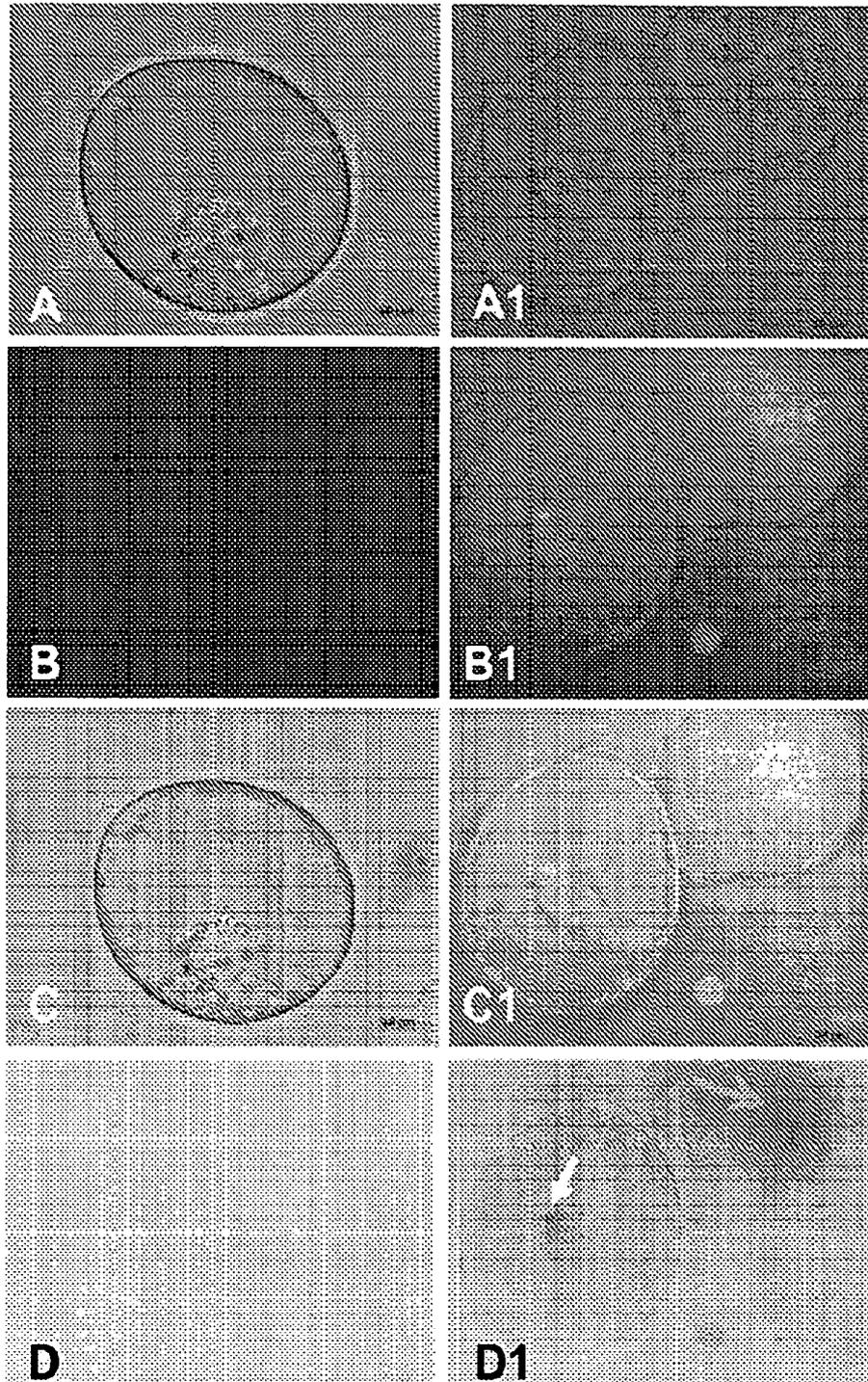


Figura 9

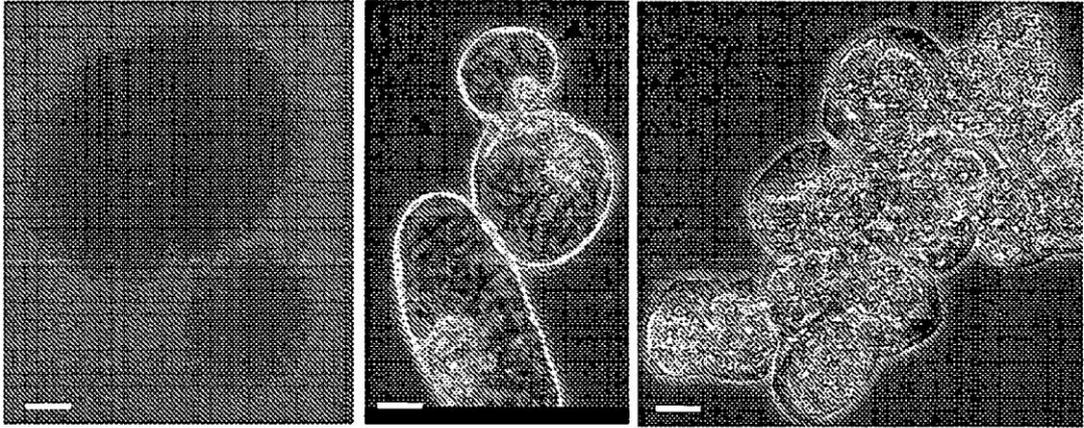


Figura 10

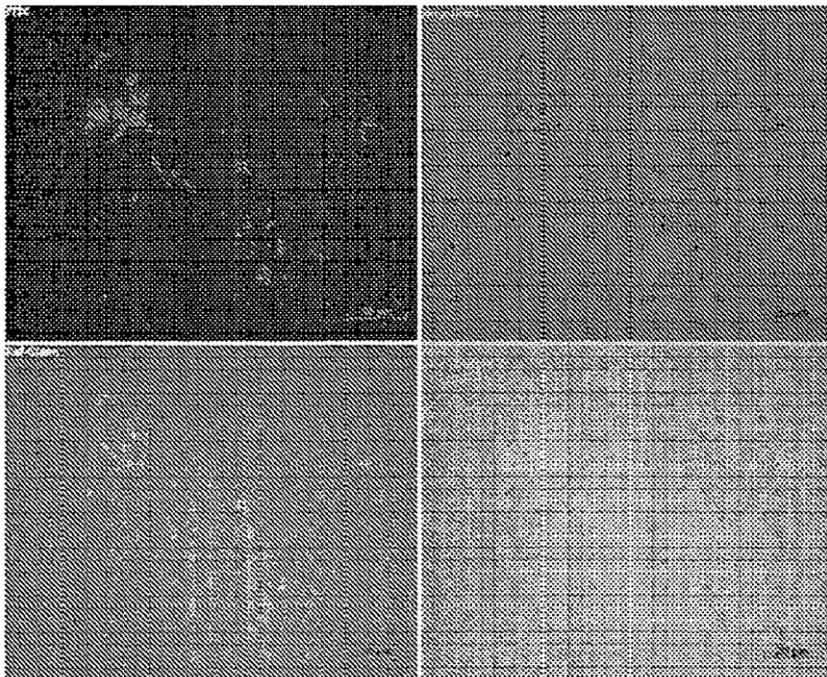


Figura 11

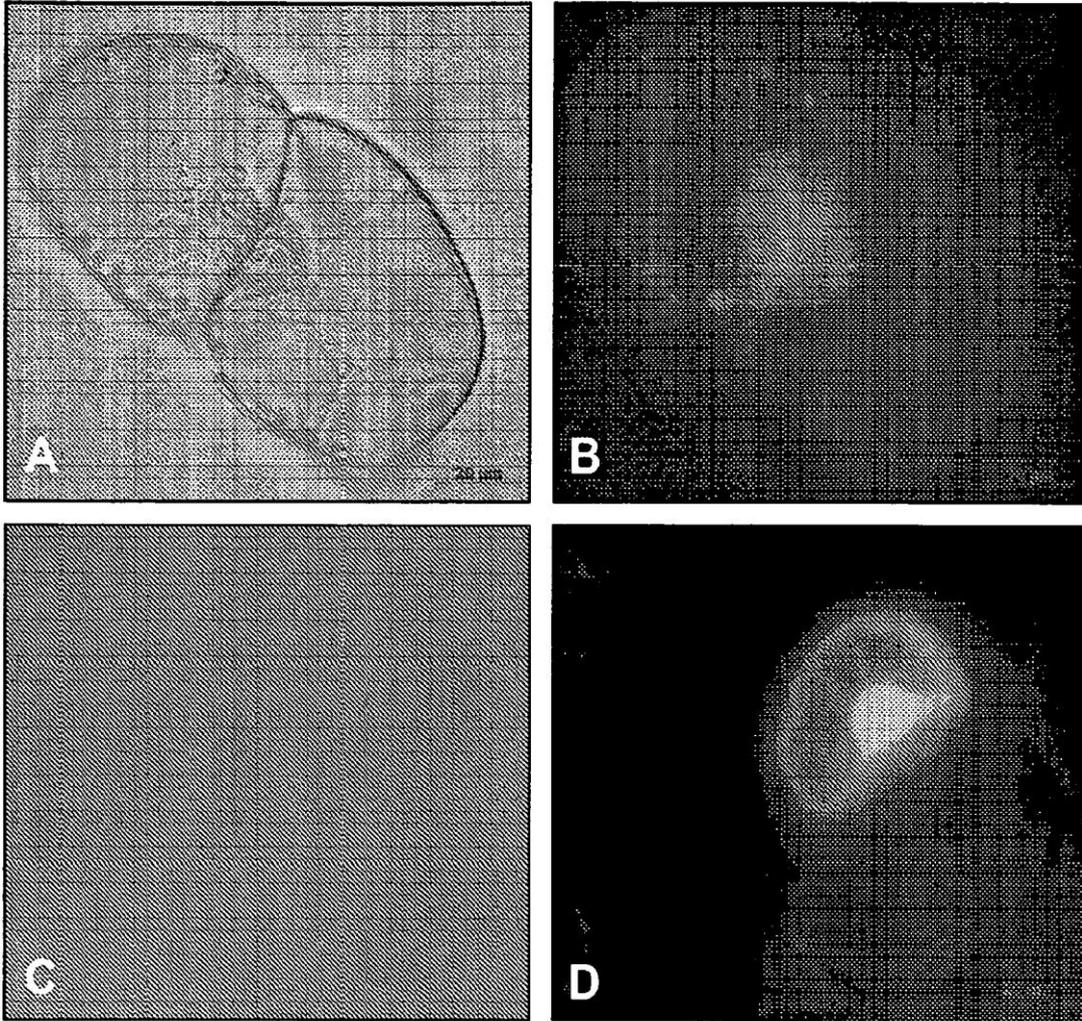


Figura 12

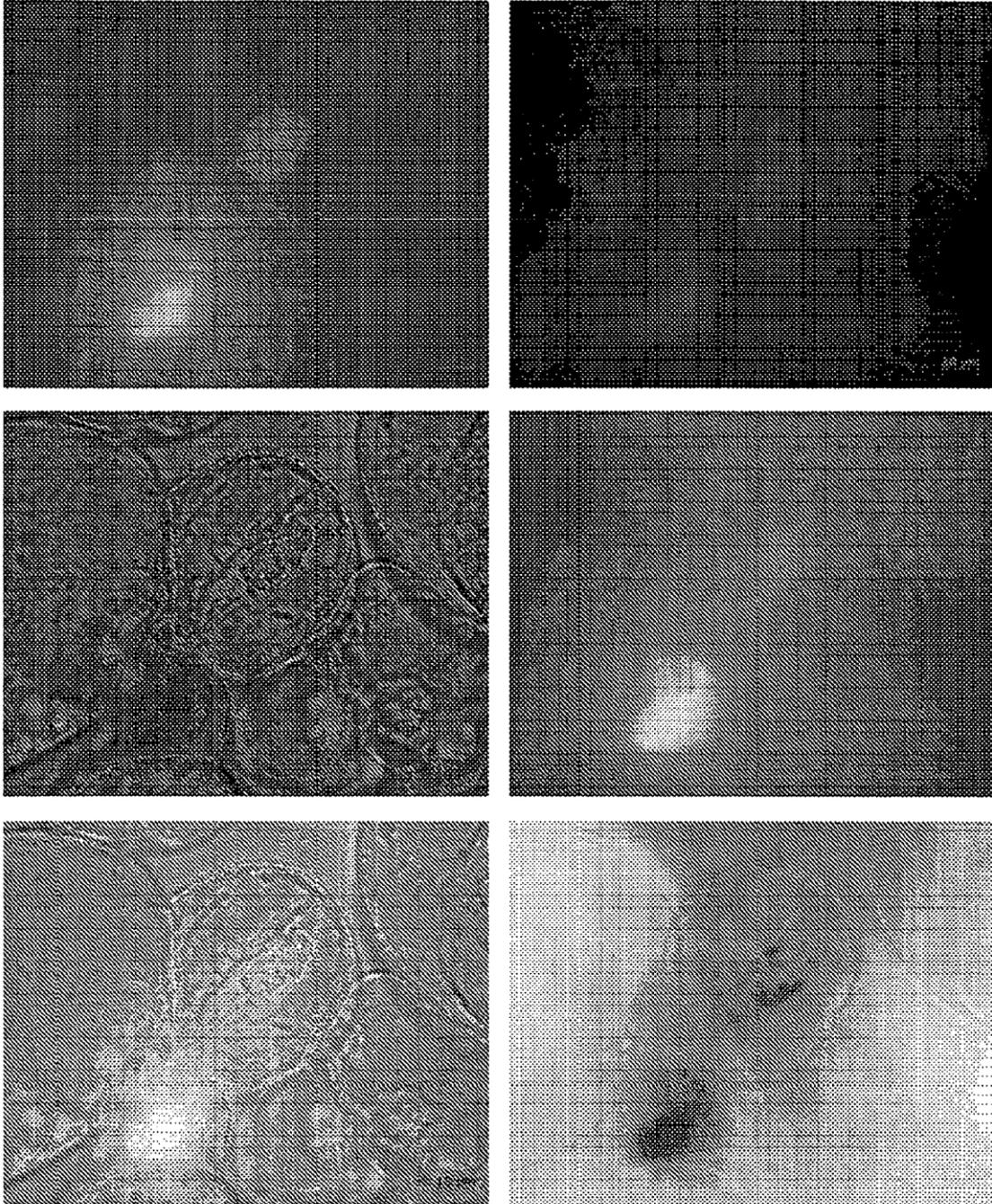


Figura 13

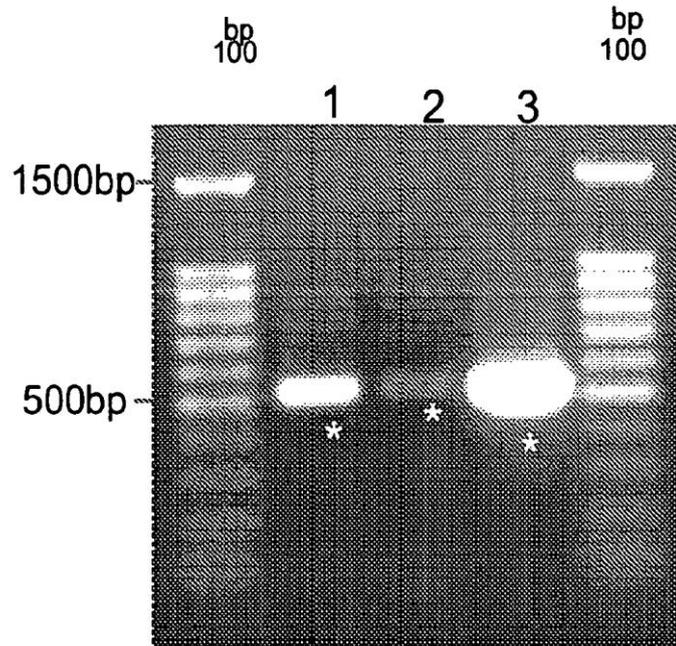


Figura 14

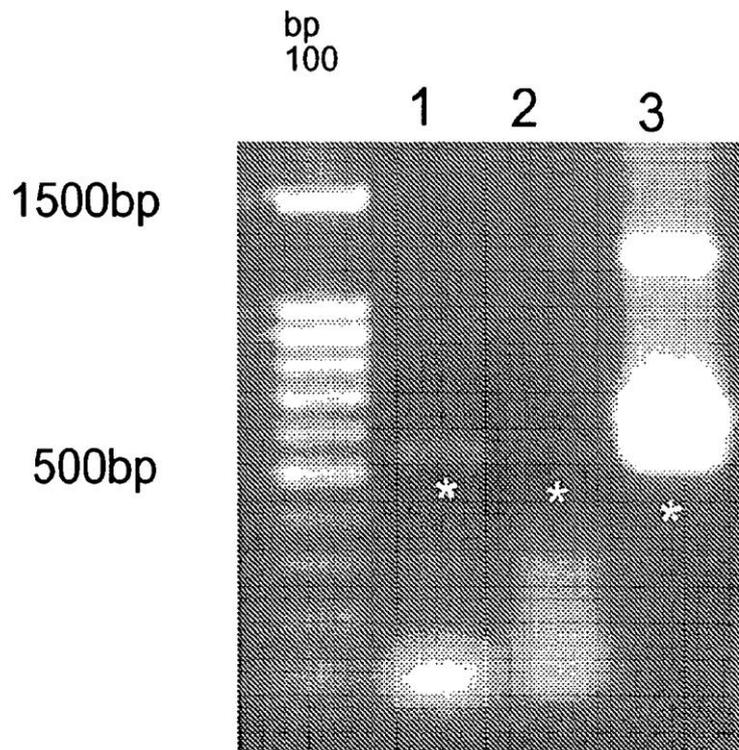
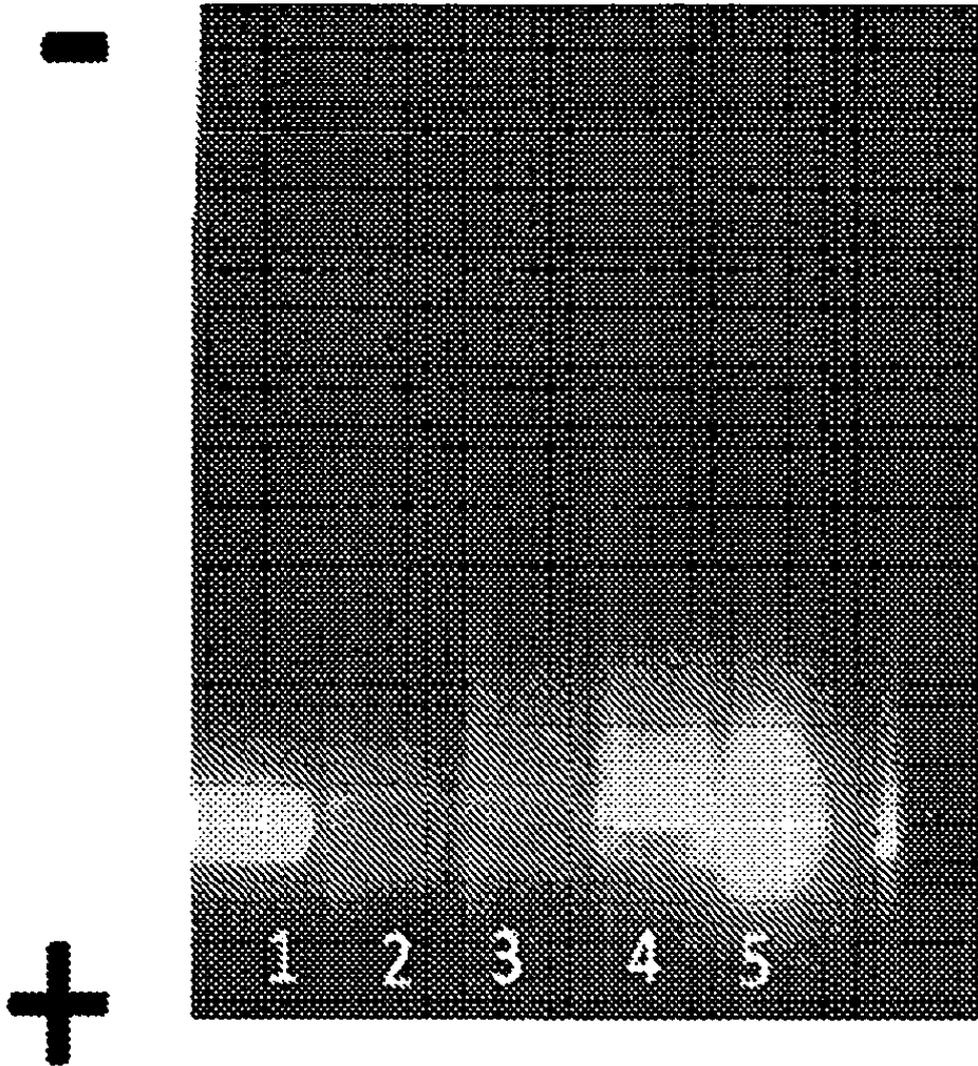


Figura 15



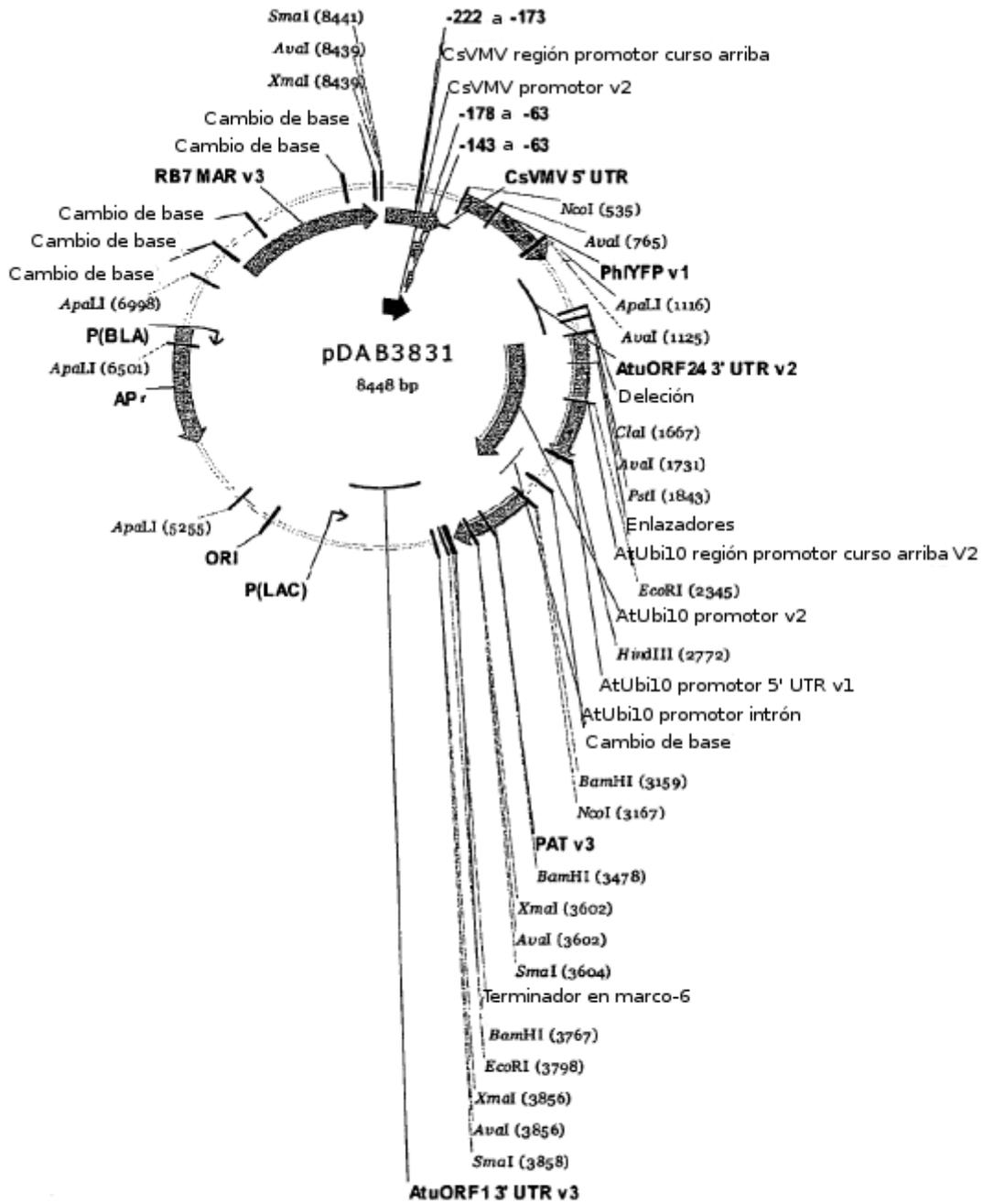


FIGURA 16