

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 125**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2004 E 10150887 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2192172**

54 Título: **Sistema para la expresión de genes en plantas**

30 Prioridad:

03.02.2003 US 444615 P

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

10.03.2015

73 Titular/es:

**IBIO, INC. (100.0%)
9 Innovation Way, Suite 100
Newark, DE 19711 , US**

72 Inventor/es:

**FEDORKIN, OLEG;
RABINDRAN, SHAILAJA y
YUSIBOV, VIDADI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 531 125 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

Sistema para la expresión de genes en plantas

Antecedentes de la invención

5 En los últimos años, las plantas se han utilizado cada vez más como un sistema huésped para la expresión de proteínas recombinantes. Dicha expresión puede lograrse bien integrando el gen de interés en el genoma de una planta, para crear una planta transgénica que expresa de forma estable la proteína deseada, o introduciendo el gen de interés en un vector de planta que se puede introducir en, y mantener de forma transitoria en, las células de plantas. Los sistemas de vectores virales han demostrado ser particularmente útiles. Yusibov et al ("Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine", *Vaccine* 20 (2002) 3155-3164) describe un sistema con un vector del virus del mosaico del tabaco (TMV) en el cual la proteína de la cubierta (CP) de TMV se reemplaza por CP del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV), con una fusión del epítipo del virus de la rabia a la CP de AIMV. WO 00/46350 describe el uso de plantas transgénicas para replicasa para expresar polipéptidos así como composiciones que comprenden vectores virales recombinantes capaces de infección sistémica para producir polipéptidos extraños en una planta huésped. Mori et al ("Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plant", *The Plant Journal* (2001) 27(1), 79-86) describen un sistema de amplificación con plantas transgénicas que tienen componentes del virus del mosaico bromo. La amplificación de los ARNm está regulada por la expresión de una subunidad de la replicasa BMV. Bendahmane et al ("Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement", *PNAS* (2002) 99(6), 3645-3650) describen un TMV con una CP mutante y derivados con fusiones GFP a CP o proteína de movimiento (MP). Sanchez-Navarro et al ("Engineering of Alfalfa mosaic virus RNA 3 into an expression vector", *Arch Virol* (2001) 146: 923-939) describen el uso de ARN 3 de AIMV como un vector para la expresión de GFP en plantas de *Nicotina tabacum* que expresan las proteínas polimerasa virales P1 y P2. Spitsin et al ("Expression of alfalfa mosaic virus coat protein in tobacco mosaic virus (TMV) deficient in the production of its native coat protein supports long-distance movement of a chimeric TMV», *PNAS* (1999) 96 2549-2553) describen la extensión del rango de huéspedes de TMV mediante la incorporación de determinantes genéticos de otro virus. Se produjo un híbrido que contenía TMV y la CP de AIMV.

30 Sin embargo, permanece una necesidad de desarrollar sistemas mejorados para expresar transgenes en plantas. Por ejemplo, una desventaja con los actuales sistemas de vectores virales es que los virus pueden infectar plantas no diana, presentando potencialmente riesgos medioambientales significativos. Además, muchos virus de plantas preparados por ingeniería disponibles no expresan transgenes a niveles deseados, y/o en las plantas o tejidos diana deseados. La presente invención aborda muchos de estos problemas, y otros.

Resumen de la invención

35 La presente invención engloba el reconocimiento de que existe una necesidad de desarrollar sistemas de expresión para plantas que presentan sólo un riesgo mínimo de contaminación medioambiental. La invención proporciona métodos y reactivos para la expresión de productos polinucleotídicos y polipeptídicos en plantas con un riesgo reducido de contaminación extendida.

40 Por ejemplo, en un aspecto, describimos conjuntos de vectores de expresión viral, cada uno de los cuales es incapaz de establecer una infección sistémica por sí mismo, pero que conjuntamente permiten la infección sistémica. La complementación cruzada (también referida como trans-complementación) por los vectores permite que una infección local inicial (por ejemplo, establecida por inoculación) se mueva a hojas no inoculadas y se establezca una infección sistémica.

45 En realizaciones específicas, la invención proporciona un kit que incluye un vector productor que incluye un polinucleótido de interés pero que carece de versiones funcionales de uno o más genes necesarios para el movimiento a larga distancia, junto con un vector vehicular que proporciona una secuencia codificadora de una proteína de movimiento a larga distancia funcional. Por ejemplo, la invención proporciona un kit para expresar un polinucleótido de interés en una célula de planta o planta completa, que comprende: (i) un vector vehicular que incluye un componente que codifica una proteína de cubierta de un primer virus de planta; y (ii) un vector productor que incluye un polinucleótido de interés, e incluye además al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un gen de proteína de cubierta funcional. La invención proporciona además un kit para expresar un polinucleótido de interés en una célula de planta o planta completa, que comprende: (i) un vector vehicular que incluye un componente que codifica una proteína de movimiento de un primer virus de planta; y (ii) un vector productor que incluye un polinucleótido de interés, e incluye además al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un gen de proteína de movimiento funcional.

55 En determinadas realizaciones de la invención el vector vehicular es defectuoso para la replicación. Por ejemplo, el vector productor puede incluir un gen de replicasa (por ejemplo, un gen de ARN polimerasa) y un gen de proteína de movimiento (de manera que el vector es competente para el movimiento célula a célula), pero puede carecer de un gen de proteína de cubierta (de manera que el vector no es competente para el movimiento a larga distancia (sistémico)). El vector vehicular puede incluir un gen de proteína de cubierta (de manera que el vector es competente

para el movimiento a larga distancia), pero puede carecer de un gen de replicasa (de manera que el vector es incapaz de auto-replicarse) Alternativamente, el vector vehicular podría incluir un gen de replicasa (de manera que el vector es competente para la replicación), y podría usarse con un vector productor que carece tanto de capacidad de replicación como de movimiento a larga distancia. Los vectores preferidos son vectores virales.

- 5 También describimos una variedad de vectores que pueden usarse como componentes del o de los sistemas inventivos o para otros propósitos. Por ejemplo, un vector que comprende: (a) uno o más componentes de un primer virus de planta; y (b) una región 3' no traducida parcial o completa de un ARN de un segundo virus de planta. En determinadas realizaciones, la región 3' no traducida facilita la diseminación sistémica del virus. La región 3' no traducida puede comprender un sitio de reconocimiento para la formación de un complejo con la proteína de cubierta.

En otros aspectos, la invención también proporciona una variedad de métodos para expresar polinucleótidos en plantas, por ejemplo, usando los vectores y los sistemas descritos en la presente memoria.

- 15 Una ventaja del sistema descrito en la presente memoria para expresar polinucleótidos en plantas es que reduce o elimina el riesgo de que los vectores, particularmente los vectores recombinantes que comprenden el o los polinucleótidos que se van a expresar, se diseminen a plantas no diana, mejorando de esta manera significativamente la seguridad medioambiental de la expresión génica en plantas y permitiendo más flexibilidad en el cultivo de las plantas receptoras.

- 20 Otra ventaja asociada con la presente invención es que permite al investigador diseñar un sistema de expresión en plantas con cualidades de más de un virus de planta. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la invención, el vector productor tiene de manera deseable el polinucleótido de interés posicionado de manera que su expresión está controlada por el promotor de la proteína de cubierta ("CP"). En muchos casos, por lo tanto, será deseable basar el vector productor en un sistema viral con un fuerte promotor de CP. Sin embargo, los virus con fuertes promotores de CP a veces tienen una limitada especificidad del huésped, por ejemplo, pueden ser incapaces de replicarse y/o conseguir movimiento de célula a célula o movimiento sistémico en determinadas plantas huésped. Puede ser deseable, por lo tanto, basar el vector vehicular en un sistema viral con una especificidad del huésped amplia, de manera que la característica de alta expresión del sistema viral del cual deriva el vector productor pueda ser explotada en un huésped que normalmente es inaccesible para ese sistema viral.

- 25 Esta solicitud se refiere a varias patentes, solicitudes de patente, y publicaciones. Los contenidos de todas éstas se incorporan en la presente memoria por referencia. Además, las publicaciones siguientes se incorporan en la presente memoria por referencia: Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, y Current Protocols in Cell Biology, todas John Wiley & Sons, N.Y., edición de julio 2002; Sambrook, Russell, y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La *Figura 1* muestra ejemplos representativos de genomas de tobamovirus.

La *Figura 2* proporciona una lista representativa de códigos de acceso para varias secuencias de genoma de TMV.

La *Figura 3* presenta una representación esquemática de determinadas familias de virus que infectan plantas.

La *Figura 4* presenta códigos de acceso para una variedad de secuencias de genoma de AIMV.

- 40 La *Figura 5* muestra una transferencia Western de protoplastos infectados con transcritos *in vitro* de Av/A4, un vector basado en AIMV empleado en determinados estudios descritos en la presente memoria (Spitsin, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96(5): 2549-2553, 1999). Las muestras se analizaron 24 horas después de la inoculación. C - es un control negativo. La flecha indica una banda de CP de AIMV detectada por anticuerpos monoclonales específicos de CP de AIMV.

La *Figura 6* muestra plantas de pimiento y plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con AIMV de tipo salvaje.

- 45 La *Figura 7* es una transferencia Western de plantas de *N. benthamiana* infectadas con transcritos *in vitro* de Av/A4. Las muestras se analizaron 12 días después de la inoculación. C - es extracto de plantas sanas. La flecha apunta a las bandas de CP de AIMV detectadas por anticuerpos monoclonales específicos de CP de AIMV.

- 50 La *Figura 8* presenta un diagrama esquemático de la organización genómica de 125C (*Figura 8A*) y D4 después de la inserción de un polinucleótido de interés (*Figura 8B*). La proteína de 126/183 kDa se requiere para la replicación del virus. La MP es la proteína de movimiento que media el movimiento célula a célula. Las flechas indican las posiciones del promotor subgenómico. La región sombreada representa secuencias de proteínas de cubierta de TMV que contienen un elemento *cis* que puede requerirse para la replicación óptima. La caja negra representa un polinucleótido de interés, por ejemplo, un gen extraño.

La *Figura 9* muestra una transferencia Western de protoplastos infectados con transcritos sintetizados *in vitro* de

125C/hGH (125C como se muestra en la *Figura 8A*, en el que el gen extraño codifica hGH). Las muestras se analizaron 24 horas después de la inoculación. Se cargó 1 ug de hGH purificada como un estándar.

La *Figura 10* es una transferencia Western que muestra la detección de hGH en plantas de *N. benthamiana* 11 días después de la infección (dpi).

5 Las *Figuras 11a-11d* presentan esquemas de varios vectores relacionados con D4. 126/183 kDa son las proteínas replicasa, MP es la proteína de movimiento requerida para el movimiento de célula a célula. Los números de los nucleótidos representan posiciones en el genoma de TMV de tipo salvaje. C3GFP es el mutante ciclo3 de la proteína verde fluorescente (GFP) (Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP, Nat Biotechnol., 14(3): 315-9, 1996). El asterisco indica C3GFP mutada en la que el sitio *NcoI* y los sitios *XhoI* en el ORF se han eliminado por mutación usando PCR. Los sitios *PstI-XhoI* se usaron para introducir secuencias de ARN3 de AIMV que incluyen el origen de ensamblaje (OAS).

15 Las *Figuras 12a-12c* muestran fotografías de plantas infectadas, demostrando que AIMV complementa D4GFP, que no tiene una secuencia codificadora de la proteína de cubierta funcional y está limitado en la diseminación sistémica, y facilita su movimiento a lo largo de la planta. La *Figura 12a* muestra una fotografía de una planta que se co-inoculó con SR-27 (un vector basado en TMV que carece de la secuencia codificadora de CP e incluye un transgén GFP bajo el control del promotor CP subgenómico) y AIMV. La imagen (tomada bajo luz UV) demuestra la diseminación del virus en las hojas superiores no inoculadas. La *Figura 12b* (tomada bajo luz UV) muestra una fotografía de una planta que se inoculó sólo con Sr-27. La ausencia de fluorescencia en las hojas superiores indica que la infección del virus se limitó a hojas inoculadas localmente. La *Figura 12c* muestra la misma planta que en la *Figura 12a*, bajo luz normal.

Definiciones

Gen: Para los propósitos de la presente invención, el término gen tiene su significado como se entiende en la técnica. En general, un gen se entiende que incluye secuencias reguladoras génicas (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) y/o secuencias intrón, además de secuencias codificadoras (marcos de lectura abiertos). Se apreciará además que la definición de gen puede incluir ácidos nucleicos que no codifican proteínas sino que proporcionan moldes para la transcripción de moléculas de ARN funcionales tales como ARNt, ARNr, etc. Para el propósito de claridad indicamos que, tal y como se usa en la presente solicitud, el término "gen" se refiere generalmente a un ácido nucleico que incluye una parte que codifica una proteína; el término puede englobar opcionalmente secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores, terminadores, etc. Esta definición no pretende excluir la aplicación del término "gen" a las unidades de expresión no codificadoras de proteína sino que clarifica que, en la mayor parte de los casos, el término tal y como se usa en este documento se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína.

Producto génico o producto de expresión: Un producto génico o producto de expresión es, en general, un ARN transcrito a partir del gen o un polipéptido codificado por un ARN transcrito a partir del gen. La expresión de un gen o un polinucleótido se refiere a (i) transcripción del ARN a partir del gen o polinucleótido; (ii) traducción del ARN transcrito a partir del gen o polinucleótido, o ambos (i) y (ii).

Aislado: Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a un compuesto o entidad que 1) se separa de al menos algunos de los componentes con los que está normalmente asociado (por ejemplo, purificado); 2) se sintetiza *in vitro*; y/o 3) se produce o prepara por un proceso que implica la mano del hombre.

40 *Naturalmente*: El término "naturalmente" o "natural", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a procesos, eventos, o cosas que ocurren en su forma relevante en la naturaleza. Por el contrario, "no natural" se refiere a procesos, eventos o cosas cuya existencia o forma implica la mano del hombre.

Unido de forma operativa: Tal y como se usa en la presente memoria, unido de forma operativa se refiere a una relación entre dos secuencias de ácido nucleico en la que la expresión de una de las secuencias de ácido nucleico está controlada por, regulada por, modulada por, etc., la otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, la transcripción de una secuencia de ácido nucleico está dirigida por una secuencia promotora unida de forma operativa; el procesamiento posterior a la transcripción de un ácido nucleico está dirigido por una secuencia de procesamiento unida de forma operativa; la traducción de una secuencia de ácido nucleico está dirigida por una secuencia reguladora de la traducción unida de forma operativa; el transporte o localización de un ácido nucleico o polipéptido está dirigido por una secuencia de transporte o localización unida de forma operativa; y el procesamiento posterior a la traducción de un polipéptido está dirigido por una secuencia de procesamiento unida de forma operativa. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico que está unida de forma operativa a una segunda secuencia de ácido nucleico está unida covalentemente, bien directamente o indirectamente, a dicha secuencia, aunque es aceptable cualquier asociación tridimensional efectiva. Se indica que una única secuencia de ácido nucleico puede estar unida de forma operativa a múltiples otras secuencias. Por ejemplo, un único promotor puede dirigir la transcripción de múltiples especies de ARN.

Polinucleótido de interés: Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido de interés" se refiere a cualquier secuencia diana que se va a expresar en células de planta, como se describe en la presente memoria.

En muchas realizaciones, el polinucleótido de interés será un polinucleótido codificador de proteína pero también puede ser una secuencia que proporciona un molde para la transcripción de un ARN estructural o un ARN activo tal como una ribozima, ARN de interferencia, etc. Frecuentemente, el polinucleótido será un gen que no se expresa en la naturaleza en el tipo de célula de planta relevante, o no se expresa al nivel que el polinucleótido se expresa cuando la expresión se consigue por la intervención de la mano del hombre, como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones de la invención, el polinucleótido comprende secuencias génicas que no se encuentran naturalmente en absoluto en la célula de planta relevante; frecuentemente incluyendo secuencias génicas que se encuentran naturalmente en otros tipos de células u organismos. Alternativamente o adicionalmente, un polinucleótido de interés es uno que no está asociado naturalmente con las secuencias de vector con las que está asociado según la presente invención. La palabra polinucleótido se utiliza indistintamente con "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" en la presente memoria.

Auto-replicación: Tal y como se usa en la presente memoria, "auto-replicación" se refiere a la capacidad de un vector de copiarse a sí mismo en el interior de una célula huésped. Un vector capaz de "auto-replicación" porta la información suficiente en sus propios elementos genéticos para no depender de otros elementos genéticos para su replicación. En general, un vector capaz de auto-replicación es uno que incluye al menos un gen de replicasa tal como una ARN polimerasa y posiblemente genes de replicasa adicionales tales como una helicasa, metiltransferasa, etc. En determinados casos, se requieren secuencias adicionales, presentes en *cis* (es decir, como parte de la secuencia del vector) o pueden facilitar la auto-replicación.

Vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a la que se ha unido y pueden incluir un plásmido, cósmido o vector viral. El vector puede ser capaz de replicación autónoma. Alternativamente o adicionalmente, un vector puede proporcionar uno o más componentes necesarios o suficientes para la auto-replicación, o para la replicación o integración de otra parte de ácido nucleico. Los vectores son típicamente ácidos nucleicos, y pueden comprender ADN y/o ARN. Los vectores preferidos se mantienen extracromosómicamente.

Descripción detallada de determinadas realizaciones preferidas de la invención

Vectores

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención proporciona kits para expresar un polinucleótido o polinucleótidos de interés en plantas. En realizaciones preferidas, estos kits incluyen uno o más componentes de vector viral. Se conoce una amplia variedad de virus que infectan varias especies de plantas, y pueden ser empleados para la expresión de polinucleótidos según la presente invención. La Figura 3 presenta una representación esquemática de ciertas familias de virus que infectan plantas. El Apéndice A proporciona una lista representativa de familias de virus de plantas, basada en el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, dsADN, ssADN, ssARN, dsARN, o sin asignar) que compone el genoma viral. Puede encontrarse información adicional, por ejemplo, en "The Classification and Nomenclature of Viruses", Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (Ed. Murphy et al.), Springer Verlag: Nueva York, 1995, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria por referencia (véase también, Grierson et al., Plant Molecular Biology, Blackie, Londres, p. 126-146, 1984; Gluzman et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, p. 172-189, 1988; Mathew, Plant Viruses Online (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/>)).

Con el fin de entrar en e infectar una célula de planta, los virus de plantas necesitan cruzar la pared celular. Además de capas protectoras de ceras y pectinas. Se piensa que la mayor parte o todos los virus de plantas dependen de la ruptura de la pared celular, en lugar de los receptores de la superficie de la pared celular, para entrar en una célula. Dicha ruptura puede causarse, por ejemplo, por daño físico a la célula, por un organismo tal como una bacteria, un hongo, un nematodo, un insecto o un ácaro que puede administrar el virus. En el laboratorio, los virus son administrados típicamente a las células de plantas simplemente frotando el virus en la planta.

Algunos virus de plantas tienen genomas segmentados, en los que dos o más partes físicamente separadas de ácido nucleico componen conjuntamente el genoma de la planta. En algunos casos, estas partes separadas se empaquetan conjuntamente en la misma cápside viral; en otros (es decir, aquellos con genomas con múltiples partes), cada segmento del genoma está empaquetado en su propia partícula viral. La infección puede conseguirse típicamente por la administración bien del ácido nucleico (por ejemplo, ARN) o cápside del virus de la planta.

Una vez que el virus ha entrado (infectado) en una célula, típicamente se replica dentro de la célula infectada y luego se disemina localmente (es decir, de célula a célula en las hojas que se infectaron inicialmente). Tras la diseminación local, el virus puede moverse a hojas no infectadas, por ejemplo, hojas superiores de la planta, lo que se refiere como infección sistémica o diseminación sistémica. En general, la diseminación de célula a célula de muchos virus de plantas requiere una proteína de movimiento funcional mientras que la diseminación sistémica requiere una proteína de cubierta funcional (y, en general, también una proteína de movimiento funcional). Además de los componentes codificadores de la proteína de movimiento y de cubierta funcional, los virus pueden contener componentes adicionales que son requeridos bien para la diseminación local o sistémica o para facilitar dicha diseminación. Estos componentes que actúan en *cis* pueden ser componentes bien codificadores o no codificadores. Por ejemplo, pueden corresponder a partes de una región 3' no traducida (UTR, también referida como NTR) de un

transcrito viral (es decir, pueden proporcionar un molde para la transcripción de una región 3' no traducida de un transcrito viral). Así, los componentes virales importantes para la infección pueden ser regiones bien codificadoras o no codificadoras de un genoma viral. Por "componente codificador de una proteína funcional" se quiere decir un polinucleótido que comprende una parte codificadora que codifica una proteína funcionalmente activa, unido de forma operativa a elementos reguladores suficientes tales como un promotor, de manera que se consigue esa expresión.

Con el fin de establecer con éxito una infección bien local (en el interior de la hoja) o sistémica un virus debe ser capaz de replicarse. Muchos virus contienen genes que codifican una o más proteínas que participan en el proceso de replicación (referidas en la presente memoria como proteínas de replicación o proteínas replicasa). Por ejemplo, muchos ARN de virus de plantas codifican una ARN polimerasa. También puede requerirse proteínas adicionales, por ejemplo, proteína(s) helicasa o metiltransferasa. El genoma viral puede contener varios componentes de secuencia además de genes funcionales que codifican proteínas de la replicación, que también se requieren para o facilitan la replicación.

Cualquier virus que infecta plantas puede usarse para preparar un vector viral o sistema de vector según la presente invención. Los virus particularmente preferidos son virus ssARN, lo más deseablemente con genoma con cadena (+). Las técnicas y reactivos para manipular el material genético presente en dichos virus son bien conocidos en la técnica. Típicamente, por ejemplo, se prepara una copia de ADN del genoma viral y se clona en un vector microbiano, particularmente un vector bacteriano. También se prefieren particularmente determinados virus ssADN, incluyendo particularmente geminivirus. Se apreciará en general que los vectores y los genomas virales de la invención pueden existir en forma de ARN o ADN. Además, cuando se hace referencia a una característica tal como un genoma o una parte de éste de un virus ARN, que está presente en un vector ADN, debe entenderse que la característica se presenta como la copia de ADN de la forma ARN.

Pueden usarse según la invención virus de varios tipos diferentes. Los virus preferidos incluyen miembros de *Bromoviridae* (por ejemplo, bromovirus, alfamovirus, ilarvirus) y *Tobamoviridae*. Determinadas especies de virus preferidas incluyen, por ejemplo, Virus de Mosaico de Alfalfa (AIMV), Virus de Mancha de Hoja Clorótica de Manzano, Virus del Tallo Ranurado del Manzano, Virus de Mosaico Estriado de Cebada, Virus del Enanismo Amarillo de Cebada, Virus Amarillo de la Remolacha, Virus del Moteado del Haba, Virus del Marchitamiento del Haba, Virus de Mosaico del Bromo (BMV), Virus Latente del Clavel, Virus del Moteado del Clavel, Virus de la Mancha Anular del Clavel, Virus del Moteado de la Zanahoria, Virus Latente de la Mandioca (CLV), Virus del Moteado Clorótico del Garbanzo, Virus del Mosaico del Garbanzo (CPMV), Virus del Mosaico del Moteado Verde del Pepino, Virus del Mosaico del Pepino, Virus Amarillo Infeccioso de la Lechuga, Virus del Moteado Clorótico del Maíz, Virus del Rayado Fino del Maíz, Virus del Rayado del Maíz (MSV), Virus del Moteado Amarillo de la Chirivía, Virus del Mosaico y Enaciones del Guisante, Virus X de la Patata, Virus Y de la Patata, Virus de la Frambuesa Enana Arbustiva, Virus de la Necrosis del Arroz (RNV), Virus del Rayado del Arroz, Virus Esférico del Tungro del Arroz, Virus del Mosaico del Césped, Virus del Mosaico del Trigo Transmitido por la Tierra, Virus del Mosaico Sureño de la Judía, Virus del Grabado del Tabaco (TEV), Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), Virus de Necrosis del Tabaco, Virus del Cascabeleo del Tabaco, Virus de la Mancha Anular del Tabaco, Virus de la Atrofia de la Mata de Tomate, Virus del Mosaico Dorado del Tomate (TGMV), y Virus del Mosaico Amarillo el Nabo (TYMV).

Los elementos de estos virus de plantas se modifican genéticamente según técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, NY, 1989; Clover et al., *Molecular Cloning*, IRL Press, Oxford, 1985; Dason et al., *Virology*, 172:285-292, 1989; Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311, 1987; French et al., *Science* 231: 1294-1297, 1986; Takamatsu et al., *FEBS Lett.* 269:73-76, 1990; Yusibov y Loesch-Fries, *Virology*, 208(1): 405-7, 1995. Spitsin et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5): 2549-53, 1999, etc.) para generar vectores virales para uso según la presente invención. Según la presente invención, se emplean al menos dos vectores, uno o ambos de los cuales es incapaz de infección sistémica, pero que conjuntamente proporcionan todas las funciones necesarias para apoyar la infección sistémica de al menos uno de los vectores y permitir la expresión de un polinucleótido de interés a lo largo de la planta. Por lo tanto la invención proporciona el reconocimiento de que los componentes virales pueden complementarse mutuamente *in trans*, para proporcionar capacidad de infección sistémica.

En particular, según la invención, se prepara un vector productor. Este vector incluye un polinucleótido de interés bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión en la planta huésped relevante. En realizaciones preferidas, el polinucleótido se pone bajo el control de un promotor viral, por ejemplo, el promotor CP. Por ejemplo, frecuentemente será deseable reemplazar el gen CP viral natural con el polinucleótido de interés. El vector productor carece de uno o más componentes requeridos para el movimiento sistémico. Por ejemplo, en determinadas realizaciones preferidas de la invención el vector productor no contiene secuencias suficientes para la expresión de CP funcional (por ejemplo, un gen CP), pero puede incluir un gen que codifica una proteína de movimiento de célula a célula. El vector productor puede contener uno o más elementos de secuencia, por ejemplo, un origen de ensamblaje, que pueden requerirse *in cis* para facilitar la diseminación del virus cuando se presenta *in cis*. Por ejemplo, el vector productor puede contener un origen de ensamblaje que se necesita para o facilita la actividad de una CP, bien del mismo tipo de virus que el virus productor o de otro virus. Dichos elementos de secuencia pueden comprender un sitio de reconocimiento para una CP. En otras realizaciones de la invención, el vector productor puede carecer de secuencias suficientes para la expresión de proteínas MP y/o replicasa funcionales. En estas

realizaciones de la invención el vector productor puede carecer o no de secuencias suficientes para la expresión de CP funcional.

Según la invención, también se prepara un vector vehicular. Este vector complementa el vector productor, es decir, proporciona componentes necesarios para la infección sistémica que faltan en el vector productor. Por ejemplo, determinados vectores vehiculares preferidos incluyen un componente codificador de proteína de cubierta funcional. Estos vectores vehiculares son adecuados para complementar un vector productor que carece de un componente codificador de proteína de cubierta funcional. El vector vehicular puede carecer de al menos de un componente viral (por ejemplo, un gen que codifica una proteína replicasa o de movimiento) requerido para la infección sistémica exitosa de una planta, siempre que dicho componente no esté también ausente en el vector productor. El vector vehicular puede incluir un polinucleótido de interés (que puede ser el mismo o diferente del polinucleótido de interés en el vector productor). En dichos casos puede ser deseable usar un vector vehicular que es defectuoso para la infección sistémica, por ejemplo, porque carece de una o más secuencias necesarias que actúan en *cis*, con el fin de minimizar la diseminación del vector vehicular recombinante en las plantas no diana.

El vector vehicular puede (pero no es necesario) incluir un componente de movimiento célula a célula (por ejemplo, un gen que codifica una proteína de movimiento célula a célula o un componente no codificador que es necesario para el movimiento célula a la célula) y/o puede carecer de uno o más componentes codificadores de proteína replicasa. En aquellas realizaciones de la invención en las que el vector vehicular no incluye un componente de movimiento célula a célula (por ejemplo, una parte codificadora de MP funcional), dicho componente debería incluirse en el vector productor.

Un conjunto de vector completo incluye todos los componentes necesarios para la infección viral sistémica exitosa y la expresión de un polinucleótido de interés. El término "componente" se pretende que incluya tanto secuencias codificadoras de proteína como secuencias no codificadoras tales como secuencias que actúan en *cis* (por ejemplo, promotores, origen de ensamblaje, partes correspondientes a las regiones no traducidas en el ARNm). Pueden derivarse diferentes vectores, o elementos de vector, de diferentes virus de plantas (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 4). De hecho, como se discute en la presente memoria, a menudo será deseable preparar vectores a partir de elementos de diferentes virus con el fin de aprovechar las diferentes características virales (por ejemplo, rango de huéspedes, nivel de actividad promotora, dimensiones del virión, etc.).

En una realización particularmente preferida de la invención, se proporciona un vector productor que incluye un polinucleótido de interés, un gen de replicasa, y un gen de proteína de movimiento y carece de un componente codificador de una proteína de cubierta funcional, y se proporciona un vector vehicular que expresa un gen de proteína de cubierta. Por ejemplo, como se describe con más detalle en los Ejemplos, un vector productor puede comprender un vector basado en TMV en el que la secuencia codificadora de CP de TMV se ha reemplazado por un polinucleótido de interés, bajo el control del promotor de CP de TMV. Este vector productor es incapaz de moverse sistémicamente. Un vector AIMV de tipo salvaje puede servir como el vector vehicular. El vector AIMV comprende un componente codificador de la proteína de cubierta funcional. La co-infección con los vectores productor y vehicular permite que la CP producida a partir de la secuencia codificadora de CP del vector AIMV complemente el vector basado en TMV, resultando en el movimiento sistémico del vector basado en TMV y la expresión del polinucleótido en las hojas que no estaban infectadas inicialmente. Alternativamente, puede usarse un vector basado en A1MV en el que uno o más componentes virales distintos de los requeridos para la expresión de CP de AIMV se han eliminado (por ejemplo, un vector basado en AIMV que carece de componentes codificadores de MP o proteína de replicación funcional), siempre que estén presentes las secuencias codificadoras de CP funcional y un promotor unido de forma operativa. La CP puede ser de AIMV o de otro virus.

En determinadas realizaciones de la invención, la CP permite el movimiento sistémico del vector vehicular, mientras en otras realizaciones se selecciona una CP que no permite el movimiento sistémico del vector vehicular pero permite el movimiento sistémico del vector productor. En aquellas realizaciones de la invención en las que el vector vehicular carece de uno o más de los componentes virales distintos de los requeridos para la expresión de CP de AIMV, el vector productor puede complementar el vector vehicular, es decir, el vector productor puede suministrar un componente tal como una secuencia codificadora de proteína MP o replicasa funcional que permite el movimiento célula a célula o replicación, respectivamente, del vector vehicular (y, preferiblemente, también el vector productor). Se apreciará que cuando bien el productor o el vehicular carece de un componente codificador de una proteína de replicación (por ejemplo, un componente codificador de una ARN polimerasa funcional) y el otro vector (vehicular o productor, respectivamente) suministra el componente que falta, frecuentemente será deseable insertar un promotor (por ejemplo, un promotor genómico) del vector que suministra el componente de replicación funcional en el vector que carece del componente codificador de la proteína de replicación funcional con el fin de conseguir una trans-complementación efectiva de la función de replicación.

Otro ejemplo de un sistema de vector viral inventivo preferido incluye un vector productor en el que un polinucleótido de interés se inserta en un vector AIMV, reemplazando el componente codificador de CP de AIMV nativo. El polinucleótido de interés se pone bajo el control del promotor de CP de AIMV. Este vector productor es incapaz de infección sistémica ya que carece de CP pero es capaz de replicarse y moverse célula a célula en una hoja infectada. El sistema también incluye un vector vehicular basado en el virus del mosaico de la coliflor (CMV) en el que la parte codificadora de de CP de AIMV, con o sin la 3' UTR de CP de AIMV se inserta en un vector CMV,

reemplazando el componente codificador de CP de CMV encontrado en el genoma de CMV natural. El componente codificador de CP de AIMV se pone bajo el control del promotor de CP de CMV. Este vector expresa CP de AIMV. La co-infección con los vectores productor y vehicular permite que CP se exprese a partir del vector vehicular para trans-complementar la ausencia de componentes codificadores de CP funcional del vector productor, permitiendo el movimiento sistémico del vector productor. La CP de AIMV también permite el movimiento sistémico del vector vehicular.

En determinadas realizaciones de la invención es deseable insertar una parte de secuencia codificadora o no codificadora del vector vehicular en el vector productor, o viceversa. Por ejemplo, determinadas secuencias pueden aumentar la replicación o facilitar el movimiento célula a célula o a larga distancia. En particular, determinadas secuencias pueden servir como sitios de reconocimiento para la formación de un complejo entre un transcrito viral y una CP (por ejemplo, un origen de ensamblaje). En tal caso, si el movimiento sistémico de un primer vector viral va a lograrse usando CP proporcionada en trans de un segundo vector viral, puede ser deseable insertar tales secuencias del segundo vector viral que facilitan la actividad de la CP en el primer vector viral. Dichas secuencias pueden comprender, por ejemplo, parte o la totalidad de un transcrito viral 3' UTR. Como se describe en el Ejemplo 4, en determinadas realizaciones de la invención parte o la totalidad de la ARN3 3' UTR del AIMV se inserta en un vector viral diferente, por ejemplo, un vector basado en TMV. La inclusión de este componente en el vector basado en TMV facilita la capacidad de CP de AIMV para trans-complementar el vector basado en TMV que carece de una parte codificadora de CP de TMV funcional. Se apreciará que este principio general puede aplicarse a cualquier sistema de vector viral que comprende vectores que trans-complementan, por ejemplo, sistemas de vector productor y vehicular que trans-complementan.

Como apreciarán los expertos en la técnica, siempre que un conjunto de vectores incluye un vector productor que es incapaz de infección viral sistémica (es decir, carece de uno o más componentes codificadores de proteína de replicación, proteína de movimiento o proteína de cubierta funcionales) y un vector vehicular que proporciona la o las funciones ausentes en el vector productor, ese conjunto es apropiado para uso según la presente invención. En determinadas realizaciones de la invención, ningún vector individual es capaz de infección viral sistémica pero, como un conjunto, uno o ambos de los vectores es competente para dicha infección y expresión del polinucleótido de interés. Dicho sistema ofrece una serie de ventajas. Por ejemplo, se apreciará que si el vector productor infecta una planta en ausencia del vector vehicular, no resultará una infección sistémica. Esto disminuye el riesgo de que el polinucleótido de interés sea expresado en plantas no deseadas (no diana), incluso de la misma especie que la planta diana. En particular, si el vector vehicular no es competente para la replicación o el movimiento célula a célula (porque carece de un componente requerido para la replicación o el movimiento célula a célula) o si es incompetente para infección sistémica (por ejemplo, porque carece de una secuencia que actúa en *cis* tal como un origen de ensamblaje que se requiere para el movimiento a larga distancia), la probabilidad de que ambos vectores productor y vehicular co-infecten una planta huésped no deseada se reduce en gran medida.

Generalmente, con el fin de preservar la función viral y también simplificar la manipulación genética, los vectores inventivos se prepararán mediante la alteración del genoma de un virus de planta existente, por ejemplo mediante la eliminación de genes particulares y/o mediante la interrupción o sustitución de secuencias particulares con el fin de inactivarlas o reemplazarlas. En tales circunstancias, los vectores inventivos mostrarán una identidad de secuencia muy alta con genomas virales naturales. Por supuesto, también pueden prepararse vectores completamente novedosos, por ejemplo, aislando separadamente elementos genéticos individuales deseados y uniéndolos conjuntamente, opcionalmente con la inclusión de elementos adicionales. Además, debe indicarse que donde se dice que un vector particular carece de un gen, proteína o actividad dados (por ejemplo, el vector productor carece de un gen de proteína de cubierta), es suficiente si dicha proteína o actividad no se expresa a partir del vector bajo condiciones de infección, aunque el vector puede todavía llevar la secuencia codificadora relevante. En general, sin embargo, es típicamente deseable eliminar las secuencias codificadoras relevantes del vector.

Análogamente, cuando se dice que un vector inventivo expresa afirmativamente una proteína o actividad particular, no es necesario que el gen relevante sea idéntico al gen correspondiente encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, se ha encontrado que la proteína de la cubierta puede tolerar a veces pequeñas deleciones (véase, por ejemplo WO 00/46350, incorporado en la presente memoria por referencia). Siempre que la proteína sea funcional, puede usarse según la presente invención. Generalmente, sin embargo, se prefiere una identidad de secuencia muy alta con la proteína natural. Por ejemplo, generalmente deben evitarse grandes deleciones (por ejemplo, mayores de aproximadamente 25 aminoácidos) según ciertas realizaciones de la invención. Típicamente, las proteínas virales expresadas según la presente invención mostrarán al menos 50%, preferiblemente 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la proteína viral natural correspondiente. Más particularmente, la proteína viral inventiva típicamente debe mostrar 100% de identidad con las partes funcionales críticas (típicamente de al menos varios aminoácidos, a menudo de al menos 10, 20, 30, 40, 50 o más aminoácidos) de la proteína viral natural relevante.

Se indica que en el caso de muchas proteínas pueden hacerse varios cambios de aminoácidos sin afectar significativamente la actividad funcional y/o varias otras propiedades de la proteína tales como estabilidad, etc. En particular, muchas proteínas toleran cambios de aminoácidos conservativos, es decir, la sustitución de un aminoácido con un aminoácido diferente que tiene propiedades similares (sustitución conservativa) en muchas posiciones sin una reducción significativa de la actividad. La sustitución de aminoácidos conservativa es muy

conocida en la técnica y representa una estrategia para obtener un polipéptido que tiene propiedades similares o sustancialmente similares a las de un polipéptido dado mientras se altera la secuencia de aminoácidos. En general, los aminoácidos han sido clasificados y divididos en grupos según (1) carga (positivo, negativo o sin carga); (2) volumen y polaridad; (3) la distancia físico-química de Grantham; y combinaciones de éstos. Véase, por ejemplo, Zhang, J., *J. Mol. Evol.*, 50: 56-68, 2000; Grantham R., *Science*, 85: 862-864, 1974; Dagan, T., et al., *Mol. Biol. Evol.*, 19(7), 1022-1025, 2002; *Biochemistry*, 4ª Ed., Stryer, L., et al., W. Freeman and Co., 1995; y Patente U.S. No. 6.015.692. Por ejemplo, los aminoácidos pueden dividirse en las 6 categorías siguientes basadas en el volumen y la polaridad: especial (C); neutro y pequeño (A, G, P, S, T); polar y relativamente pequeño (N, D, Q, E), polar y relativamente grande (R, H, K), no polar y relativamente pequeño (I, L, M, V) y no polar y relativamente grande (F, W, Y). Una sustitución de aminoácidos conservativa puede definirse como una que reemplaza un aminoácido con un aminoácido del mismo grupo. Así, se puede derivar una variedad de proteínas funcionalmente equivalentes haciendo una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una proteína viral dada.

Plantas

Cualquier planta susceptible a la infección viral puede utilizarse según la presente invención. En general, a menudo será deseable utilizar plantas que sean susceptibles de crecer bajo condiciones definidas, por ejemplo en un invernadero y/o en sistemas acuosos. También puede ser deseable seleccionar plantas que normalmente no son consumidas por seres humanos o animales domésticos y/o no son normalmente parte de la cadena alimenticia humana, de manera que pueden crecerse en el exterior sin preocupaciones respecto a que el polinucleótido expresado pueda ser ingerido de manera indeseable. Sin embargo, en otras realizaciones, será deseable emplear plantas comestibles.

A menudo, determinadas características deseables de la planta serán determinadas por el polinucleótido particular que se va a expresar. Para dar sólo algunos ejemplos, cuando el polinucleótido codifica una proteína que se va a producir con alto rendimiento (como a menudo será el caso, por ejemplo, cuando se van a expresar proteínas terapéuticas), a menudo será deseable seleccionar plantas con una biomasa relativamente alta (por ejemplo, tabaco, que tiene las ventajas adicionales de que es altamente susceptible a la infección viral, tiene un período de crecimiento corto y no está en la cadena alimenticia humana). Cuando el polinucleótido codifica una proteína cuya actividad completa requiere (o es inhibida por) una modificación posterior a la traducción particular, la capacidad (o incapacidad) de ciertas especies de plantas para llevar a cabo la modificación relevante (por ejemplo, una glicosilación particular) puede dirigir la selección.

En determinadas realizaciones preferidas de la invención, se utilizan plantas cultivadas, o plantas relacionadas con cultivo. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se utilizan plantas comestibles.

Las plantas preferidas para uso según la presente invención incluyen las Angiospermas, Briofitas (por ejemplo, Hepaticae, Musci, etc.), Pteridofitos (por ejemplo, helechos, equisetos, licopodios), Gimnospermas (por ejemplo, coníferas, cicas, Ginko, Gnetales) y Algas (por ejemplo, Chlorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae y Eu-glenophyceae). Se prefieren particularmente los miembros de la familia Leguminosae (Fabaceae; por ejemplo, guisante, alfalfa, soja); Gramineae (Poaceae; por ejemplo, maíz, trigo, arroz); Solanaceae, particularmente del género *Lycopersicon* (por ejemplo, tomate), *Solanum* (por ejemplo, patata, berenjena), *Capsium* (por ejemplo, pimienta) o *Nicotiana* (por ejemplo, tabaco); Umbelliferae, particularmente del género *Daucus* (por ejemplo, zanahoria), *Apium* (por ejemplo, apio) o *Rutaceae* (por ejemplo, naranjas); Compositae, particularmente del género *Lactuca* (por ejemplo, lechuga); Brassicaceae (Cruciferae), particularmente del género *Brassica* o *Sinapis*. Los miembros particularmente preferidos de la familia Brassicaceae incluyen *Brassica campestris*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleraceae*, *B. tourni-fortii*, *Sinapis alba* y *Raphanus sativus*.

El sistema inventivo puede emplearse para infectar, y/o expresar un polinucleótido en plantas en cualquier estadio del desarrollo incluyendo, por ejemplo, plantas maduras, plántulas, brotes, y semillas. El sistema puede emplearse para infectar cualquier parte de una planta (por ejemplo, raíces, hojas, tallos, etc.). En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el sistema se usa para infectar brotes. Generalmente, una planta se considera que es un brote cuando es una plántula que no requiere nutrientes o energía externos en forma de luz o calor más allá de lo que se requiere para lograr las temperaturas normales de germinación. A menudo, una plántula tiene menos de dos semanas de edad, preferiblemente menos de 10 días de edad, se considera un brote.

Polinucleótidos de interés

Las enseñanzas de la presente invención pueden emplearse para administrar y/o expresar en células de planta cualquier polinucleótido de interés. Por ejemplo, los polinucleótidos codificadores de proteínas pueden expresar enzimas, anticuerpos, hormonas, citoquinas, factores reguladores, proteínas estructurales, o cualquier otra proteína o polipéptido de interés. Las proteínas codificadas pueden ser proteínas naturales o pueden ser proteínas diseñadas o preparadas por ingeniería, incluyendo por ejemplo proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión que incorporan parte o la totalidad de una proteína del virus de planta tal como MP o CP). En determinadas realizaciones de la invención, el polinucleótido de interés comprende una parte que codifica una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta 6X-His, etiqueta HA, etiqueta Myc, etiqueta FLAG, etc. Dichas etiquetas pueden simplificar el aislamiento y/o purificación de la proteína. En determinadas realizaciones de la invención, la etiqueta es una etiqueta escindible,

por ejemplo, una etiqueta escindible por una proteasa tal como trombina, de manera que la etiqueta puede ser fácilmente eliminada después de la purificación, resultando en una proteína con la secuencia de tipo salvaje.

En algunos casos, puede ser deseable utilizar el sistema inventivo para expresar más de una cadena polipeptídica en la misma planta huésped (por ejemplo, usando dos vectores productores diferentes, insertando dos polinucleótidos diferentes en un vector productor, o insertando un polinucleótido en el vector productor y uno en el vector vehicular), por ejemplo con el fin de producir una proteína multimérica o para producir simultáneamente dos proteínas diferentes).

Por ejemplo, en determinadas realizaciones preferidas de la invención, la presente invención emplea un polinucleótido que codifica una proteína terapéuticamente activa. Las proteínas ejemplares que han sido aprobadas para usos terapéuticos incluyen, por ejemplo, insulina, hormona de crecimiento humana, interferones, albúmina, tPA, eritropoyetina, interleuquinas, factor VIII, ADNasa, factor IX, PDGF, FSH, receptor de TNF (forma soluble), calcitonina, y una gran variedad de inmunoglobulinas. Por supuesto, la invención no está limitada a tales proteínas aprobadas, sino que engloba la expresión de cualquier polinucleótido o polinucleótidos, ya sean codificadores de proteína o no, y particularmente engloba la expresión de cualquier polinucleótido que codifica cualquier proteína terapéuticamente activa, ya tenga un origen procarionta o eucariota, etc..

Generalmente, las proteínas farmacéuticas de interés incluyen, pero no se limitan a, hormonas (insulina, hormona tiroidea, catecolaminas, gonadotrofinas, hormonas tróficas, prolactina, oxitocina, dopamina, somatotropina bovina, leptinas y similares), hormonas de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento humana), factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento semejante a insulina y similares), receptores de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas del sistema inmune (por ejemplo, interleuquinas, factor estimulador de colonias (CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones, integrinas, adhesinas, selectinas, receptores de direccionamiento, receptores de las células T, inmunoglobulinas, antígenos solubles del complejo mayor de histocompatibilidad, antígenos inmunológicamente activos tales como antígenos o alérgenos bacterianos, parasitarios, o virales), autoantígenos, anticuerpos), enzimas (activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, biosintéticas o de degradación del colesterol, enzimas esteriodogénicas, quinasas, fosfodiesterasas, metilasas, desmetilasas, deshidrogenasas, celulasas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, aromatasas, citocromos, adenilato o guanilato ciclasas, neuramididasas y similares), receptores (receptores de hormonas esteroides, receptores de péptido), proteínas de unión (proteínas de unión de esteroides, hormona de crecimiento o proteínas de unión a factores de crecimiento y similares), factores de transcripción y traducción, oncoproteínas o proto-oncoproteínas (por ejemplo, proteínas del ciclo celular), proteínas del músculo (miosina o tropomiosina y similares), mieloproteínas, proteínas neuroactivas, proteínas supresoras del crecimiento tumoral (angiostatina o endostatina, ambas de las cuales inhiben la angiogénesis), proteínas anti-sepsis (proteína bactericida que aumenta la permeabilidad), proteínas estructurales (tales como colágeno, fibroína, fibrinógeno, elastina, tubulina, actina y miosina), proteínas de la sangre (trombina, albúmina sérica, Factor VII, Factor VIII, insulina, Factor IX, Factor X, activador de plasminógeno tisular, Proteína C, factor de von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasa, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSF) o Factor VIII modificado, anticoagulantes tales como huridina) y similares.

En un ejemplo particular, la presente invención puede ser utilizada para producir componentes de vacuna. En general, es deseable incluir en las vacunas proteínas, o partes de proteínas, a las que el sistema inmune de un ser humano o animal está expuesto cuando el ser humano o animal se infecta con un patógeno, o padece algún otro evento indeseable (por ejemplo, desarrollo de un tumor). Así, las proteínas o polipéptidos que pueden formularse en una vacuna incluyen, por ejemplo, proteínas de cubierta viral, proteínas G virales, proteínas de la pared celular microbiana, proteínas de toxina microbiana, antígenos específicos de tumor, etc.

En otras realizaciones, el sistema inventivo puede usarse para expresar un polinucleótido que codifica una enzima que sintetiza o modifica un agente biológicamente activo. Por ejemplo, determinadas enzimas (por ejemplo, poliquétido sintetasas, polipéptido sintetasas, terpeno sintetasas, etc.) sintetizan moléculas pequeñas con actividades biológicas interesantes, incluyendo actividades terapéuticas (por ejemplo, actividades antibióticas, anticancerosas, inmunosupresoras, etc.). Además, se conoce un gran número de enzimas que modifican proteínas o sustratos de molécula pequeña (por ejemplo, quinasas, hidrolasas, transferasas, etc.). Véase la Patente U.S. No. 6.500.644 para proteínas adicionales que pueden expresarse de manera deseable en plantas usando los sistemas inventivos descritos en la presente memoria.

En otras realizaciones, el sistema inventivo puede usarse para producir reactivos de diagnóstico o investigación incluyendo, por ejemplo, anticuerpos.

En otras realizaciones más, el sistema inventivo puede utilizarse para producir proteínas nutricionalmente relevantes u otros productos. Las proteínas nutricionalmente relevantes incluyen, por ejemplo, las proteínas que se encuentran naturalmente en los alimentos consumidos por los seres humanos o animales domésticos (por ejemplo, gatos, perros). Otros ejemplos incluyen proteínas que tienen una composición equilibrada de aminoácidos, por ejemplo, proteínas que tienen una composición tal como las usadas para la nutrición parenteral total (TPN), etc.

En otras realizaciones más, el sistema inventivo puede utilizarse para expresar polinucleótidos que no codifican necesariamente proteínas, por ejemplo, para producir especies de ARN activas, por ejemplo, ribozimas o ARN de interferencia que silencian la expresión génica (bien ARN bicatenarios largos o ARN de interferencia cortos (siARN) o ARN en horquilla cortos (shARN)). En algunas realizaciones, pueden producirse ribozimas o ARN de interferencia dirigidos a genes de planta diana, de manera que se crea una planta alterada, por ejemplo, que no expresa un receptor particular para un patógeno de plantas, o una proteína alergénica particular.

Introducción de vectores en plantas

En general, los vectores virales pueden administrarse a las plantas según técnicas conocidas. Por ejemplo, los vectores en sí mismos pueden aplicarse directamente a las plantas (por ejemplo, mediante inoculaciones abrasivas, inoculaciones por pulverización mecanizada, infiltración por vacío, bombardeo de partículas, o electroporación). Alternativamente, pueden prepararse viriones (por ejemplo, a partir de plantas ya infectadas) y pueden aplicarse a otras plantas según técnicas conocidas.

Como se ha indicado anteriormente, en realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, los vectores virales se aplican a brotes (por ejemplo, mediante infiltración o inoculación mecánica [pulverización]).

Cuando la infección se quiere conseguir mediante la aplicación directa de un genoma viral en una planta, puede usarse cualquier técnica disponible para preparar el genoma. Por ejemplo, muchos virus que se emplean con éxito según la presente invención tienen genomas de ssARN. El ssARN puede prepararse por la transcripción de una copia del ADN del genoma, o por replicación de una copia del ARN, bien *in vivo* o *in vitro*. Dada la fácil disponibilidad de sistemas de transcripción *in vitro* fáciles de usar (por ejemplo, SP6, T7 lisado de reticulocitos, etc.), y también la conveniencia de mantener una copia de ADN de un vector de ARN, se espera que los vectores ssARN inventivos se prepararán frecuentemente por transcripción *in vitro*, particularmente con T7 o SP6 polimerasa.

Aislamiento y/o formulación de los productos de expresión de polinucleótidos

En muchas realizaciones de la presente invención, será deseable aislar los productos de expresión de los polinucleótidos de los tejidos de la planta que los expresan. También puede ser deseable formular dichos productos aislados para su uso pretendido (por ejemplo, como un agente farmacéutico o de diagnóstico, o como un reactivo, etc.). En otras realizaciones, será deseable formular los productos junto con algunos o todos los tejidos de la planta que los expresan.

Cuando es deseable aislar el producto de expresión de parte o todo el tejido de la planta que lo expresa, se puede emplear cualquiera de las técnicas disponibles de purificación. Los expertos en la técnica están familiarizados con un amplio rango de procedimientos de fraccionamiento y separación (véase, por ejemplo, Scopes et al., *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Ed., Janson et al., *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Wiley-VCH, 1998; Springer-Verlag, NY, 1993; Roe, *Protein Purification Techniques*, Oxford University Press, 2001, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia). A menudo, será deseable rendir el producto más de aproximadamente 50%, preferiblemente más de aproximadamente 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% puro.

Cuando es deseable formular el producto junto con el material de la planta, con frecuencia será deseable haber utilizado una planta que no es tóxica para el receptor relevante (por ejemplo, un ser humano u otro animal). El tejido de la planta relevante (por ejemplo, hojas) puede ser simplemente cosechado y procesado según técnicas conocidas en la técnica, con debida consideración a mantener la actividad del producto expresado. En determinadas realizaciones de la invención, es deseable haber expresado el polinucleótido en una planta comestible (y, específicamente en las partes comestibles de la planta) de manera que el material pueda comerse posteriormente. Por ejemplo, cuando el polinucleótido codifica una proteína nutricionalmente relevante, o una proteína terapéutica que es activa después de administración oral (cuando se formula correctamente), puede ser deseable producir la proteína en un parte comestible de la planta, y formular el polinucleótido expresado para administración oral junto con la parte o la totalidad del material de la planta con el que se expresó el polinucleótido.

Cuando el polinucleótido codifica o produce un agente terapéutico, puede formularse según técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede formular una cantidad efectiva de un producto farmacéuticamente activo junto con uno o más materiales vehiculares orgánicos o inorgánicos, líquidos o sólidos, farmacéuticamente adecuados. Un producto farmacéuticamente activo producido según la presente invención puede emplearse en formas de dosificación tales como comprimidos, cápsulas, tabletas, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cápsulas, cremas, pomadas, aerosoles, paquetes de polvo, disoluciones líquidas, disolventes, diluyentes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes y aglutinantes sólidos, siempre que no se destruya la actividad biológica de la proteína por dicha forma de dosificación.

Los materiales que puedan servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; goma de tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva,

aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como un propilen glicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico y disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimoquinta Edición, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton PA, 1975). Por ejemplo, el producto de expresión del polinucleótido puede proporcionarse como una composición farmacéutica mediante la preparación de grageas por mezclado granulación convencional, disolución, liofilización, o procesos similares.

En determinadas realizaciones preferidas, puede ser deseable prolongar el efecto de una preparación farmacéutica ralentizando la absorción del producto farmacéuticamente activo (por ejemplo, proteína) que se inyecta por vía subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del producto depende de su velocidad de disolución, que a su vez, puede depender del tamaño y forma. Alternativamente, la absorción retardada de un producto administrado por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el producto en un vehículo oleoso. Las formas inyectables de liberación lenta se preparan mediante la formación de matrices de microencapsulación de la proteína en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de producto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhidridos). Las formulaciones inyectables de liberación lenta pueden prepararse atrapando el producto en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos corporales.

Las preparaciones administradas por vía enteral de productos farmacéuticamente activos pueden introducirse en forma sólida, semi-sólida, suspensión o emulsión y pueden formarse con cualesquiera vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua, agentes de suspensión y agentes emulsionantes. Los productos de expresión también pueden administrarse mediante bombas o formas de liberación sostenida, especialmente cuando se administran como una medida preventiva, con el fin de evitar el desarrollo de una enfermedad en un sujeto o se mejora o retrasa una enfermedad ya establecida.

Los productos farmacéuticamente activos, opcionalmente junto con tejido de planta, están particularmente bien adaptados para administración oral como composiciones farmacéuticas. El material de plantas cosechado puede procesarse de cualquiera de una variedad de formas (por ejemplo, secado al aire, liofilización, extracción etc.), dependiendo de las propiedades del producto terapéutico deseado y su forma deseada. En realizaciones preferidas, dichas composiciones como se han descrito anteriormente son ingeridas por vía oral solo o son ingeridas junto con alimentos o piensos o una bebida. Las composiciones para administración oral incluyen plantas infectadas; extracciones de las plantas infectadas, y proteínas purificadas de plantas infectadas proporcionadas como polvos secos, productos alimenticios, disolventes acuosos o no acuosos, suspensiones, o emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietilén glicol, aceite vegetal, aceite de pescado, y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones emulsiones o suspensiones agua-alcohol, incluyendo disolución salina y vehículos parenterales mediales tamponados incluyendo disolución de cloruro de sodio, disolución de dextrosa de Ringer, disolución de dextrosa más cloruro de sodio, disolución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijados. Los ejemplos de polvos secos incluyen cualquier biomasa de planta infectada que ha sido secada, por ejemplo, liofilizada, secada al aire o secada por pulverización. Por ejemplo, las plantas pueden secarse al aire poniéndolas en un secador de aire comercial a aproximadamente 120 grados Fahrenheit hasta que la biomasa contiene menos de 5% de humedad en peso. Las plantas secas pueden almacenarse para procesarse adicionalmente como sólidos a granel o procesarse por molienda hasta un polvo de tamaño mesh deseado. Alternativamente, la liofilización puede usarse para productos que son sensibles al secado al aire. Los productos pueden liofilizarse poniéndolos en un secador de vacío y liofilizándolos bajo vacío hasta que la biomasa contiene menos de aproximadamente 5% de humedad en peso. El material seco puede procesarse adicionalmente como se describe en la presente memoria.

Las plantas infectadas de la presente invención pueden administrarse como o junto con una o más preparaciones herbales. Las preparaciones herbales útiles incluyen preparaciones herbales líquidas y sólidas. Algunos ejemplos de preparaciones herbales incluyen tinturas, extractos (por ejemplo, extractos acuosos, extractos de alcohol), decocciones, preparaciones secas (por ejemplo, secadas al aire, secadas por pulverización, congeladas o liofilizadas), polvos (por ejemplo, polvo liofilizado) y líquidos. Las preparaciones herbales pueden proporcionarse en cualquier vehículo de administración estándar, tal como una cápsula, comprimido, supositorio, dosificación líquida, etc. Los expertos en la técnica apreciarán las distintas formulaciones y modalidades de administración de preparaciones herbales que pueden ser aplicadas a la presente invención.

Los expertos en la técnica también apreciarán que un método particularmente preferido de obtención de los productos farmacéuticamente activos deseados es por extracción. Las plantas infectadas pueden extraerse para retirar los productos deseados de la biomasa residual, incrementando de esta manera la concentración y la pureza del producto. Las plantas también pueden extraerse en una disolución tamponada. Por ejemplo, las plantas cosechadas frescas pueden transferirse a una cantidad de agua helada en una proporción de uno a uno en peso

que ha sido tamponada, por ejemplo, con tampón fosfato. También pueden añadirse, según se requiera, inhibidores de proteasas. Las plantas pueden romperse por mezclado o molienda vigorosa mientras se suspende en la disolución de tampón y la biomasa extraída se retira por filtración o centrifugación. El producto transgénico presente en la disolución puede ser purificado adicionalmente por etapas adicionales o convertirse en un polvo seco por liofilización o precipitación. La extracción también puede realizarse por prensado. Las plantas vivas también pueden extraerse por prensado en una prensa o aplastándolas al pasar a través de rodillos muy juntos. Los fluidos expresados a partir de las plantas machacadas se recogen y procesan según métodos muy conocidos en la técnica. La extracción por prensado permite la liberación de los productos en una forma más concentrada. Sin embargo, el rendimiento global del producto puede ser menor que si el producto se extrae en disolución.

Las plantas infectadas, extracciones, polvos, preparaciones secas y productos proteicos purificados, etc. inventivos, también pueden estar en forma encapsulada con o sin uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólida de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de liberación controlada y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En dichas formas de dosificación sólida el producto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es habitual, sustancias adicionales aparte de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de comprimidos y otros auxiliares de la formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponadores. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal que liberan el o los ingredientes activos sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

En otras realizaciones particularmente preferidas, una planta infectada que expresa un producto farmacéuticamente activo según la presente invención, o biomasa de una planta infectada, se administra por vía oral como alimento medicinal. Dichas composiciones comestibles se consumen comiéndolas crudas, si están en una forma sólida, o bebiéndolas, si están en una forma líquida. En una realización preferida, el material de planta transgénica se ingiere directamente sin una etapa de procesamiento previa o después de una mínima preparación culinaria. Por ejemplo, la proteína farmacéuticamente activa se expresa en un brote del que puede comerse directamente. Por ejemplo, el polinucleótido se expresa en un brote de alfalfa, brote de frijol, o brote de hoja de espinacas o lechuga, etc. En una realización alternativa, la biomasa de la planta se procesa y el material recuperado después de la etapa de procesamiento se ingiere.

Los métodos de procesamiento usados preferentemente en la presente invención son métodos usados comúnmente en la industria alimentaria o de piensos. Los productos finales de dichos métodos incluyen todavía una cantidad substancial del polinucleótido farmacéuticamente activo expresado y preferentemente se comen o beben convenientemente. El producto final también puede mezclarse con otras formas alimentarias o de pienso, tales como sales, vehículos, potenciadores del sabor, antibióticos, y similares, y consumirse en forma sólida, semi-sólida, suspensión, emulsión, o líquida. En otra realización preferida, dichos métodos incluyen una etapa de conservación, tal como, por ejemplo, pasteurización, cocinado o adición de agentes conservantes y de preservación. Cualquier planta se usa y procesa en la presente invención para producir materia de planta comestible o bebible. La cantidad de producto de expresión del polinucleótido farmacéuticamente activo en una preparación de un brote comestible o bebible puede ensayarse por métodos estándar en la técnica, por ejemplo, análisis por electroforesis en gel, ELISA o transferencia Western, usando un anticuerpo específico para el producto. Esta determinación puede usarse para estandarizar la cantidad de proteína ingerida. Por ejemplo, la cantidad de producto terapéuticamente activo en un zumo de brote es determinada y regulada, por ejemplo, mediante el mezclado de lotes de producto que tienen diferentes niveles de proteína de manera que se puede estandarizar la cantidad de zumo que se debe beber para ingerir una dosis única. El entorno contenido, regulable, de la presente invención, sin embargo, debe minimizar la necesidad de llevar a cabo procedimientos de estandarización.

Una proteína farmacéuticamente activa producida en una planta infectada y comida por un huésped se absorbe por el sistema digestivo. Una ventaja de la ingestión de tejido de planta infectada que ha sido sólo mínimamente procesado, es proporcionar la encapsulación o secuestro de la proteína en las células de la planta. Así, la proteína puede recibir al menos alguna protección frente a la digestión en el tracto digestivo superior antes de alcanzar el estómago o el intestino y una mayor proporción de activos estaría disponible para la captación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse terapéuticamente o profilácticamente. En determinadas realizaciones preferidas, las composiciones pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad. Por ejemplo, se puede tratar a cualquier individuo que padece una enfermedad o que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad. Se apreciará que puede considerarse que un individuo presenta riesgo de desarrollar una enfermedad sin haber sido diagnosticado con ninguno de los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, si el individuo tiene un marcador genético particular que se identifica como asociado con un riesgo incrementado para desarrollar una enfermedad particular, se considerará que ese individuo presenta riesgo de desarrollar la enfermedad. De manera similar, si los miembros de la familia de un individuo han sido diagnosticados con una enfermedad particular, por ejemplo, cáncer, puede considerarse que el individuo presenta riesgo de desarrollar esa enfermedad.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilen glicol, 1, 3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilen glicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de éstos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saporíferos y agentes perfumantes.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando las composiciones de esta invención con excipientes o vehículos adecuados no irritantes tales como manteca de cacao, polietilen glicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan la proteína activa.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, pulverizadores, inhalantes o parches. El producto activo, o preparación de éste, se mezcla bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualesquiera conservantes o tampones necesarios según se requiera. La formulación oftálmica, gotas para los oídos y las gotas oculares también están contempladas como que están en el alcance de esta invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar la administración controlada de una proteína farmacéuticamente activa en el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse suspendiendo o dispensando el producto farmacéuticamente activo en el medio apropiado. También pueden utilizarse potenciadores de la absorción para incrementar el flujo de la proteína farmacéuticamente activa a través de la piel. La velocidad puede controlarse bien proporcionando una membrana que controla la velocidad o dispersando la proteína farmacéuticamente activa en una matriz polimérica o gel.

Las composiciones se administran en cantidades tales y durante un tiempo tal como sea necesario para conseguir el resultado deseado. Como se ha descrito anteriormente, en determinadas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una composición farmacéutica es la cantidad efectiva para tratar, atenuar o prevenir una enfermedad en un huésped. Así, la "cantidad efectiva para tratar, atenuar o prevenir la enfermedad", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición farmacéutica para tratar, atenuar o prevenir la enfermedad en cualquier huésped. Sólo como un ejemplo, la "cantidad terapéuticamente efectiva" puede ser una cantidad para tratar, atenuar o prevenir la diabetes.

La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, del estadio de la enfermedad, la mezcla farmacéutica particular, su modo de administración y similares. Las plantas infectadas de la invención y/o preparaciones de proteína de éstas se formulan preferentemente en formas de dosificación unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una unidad físicamente discreta de producto de expresión de polinucleótido farmacéuticamente activo apropiada para el paciente a ser tratado. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención es decidido preferiblemente por el médico responsable dentro del alcance del criterio médico responsable. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier paciente u organismo particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo del paciente, dieta del paciente, condición farmacocinética del paciente, el tiempo de la administración, vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado; y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

También se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación, es decir, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse concurrentemente con, antes de, o posteriormente a, uno o más terapéuticos deseados o procedimientos médicos adicionales. La combinación particular de terapias (terapéuticos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se quiere conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto inventivo puede administrarse concurrentemente con otro agente anticanceroso), o pueden conseguir efectos diferentes.

Ejemplificación

Ejemplo 1: Construcción de los vectores inventivos

Hemos preparado sistemas de vectores que incluyen componentes de dos virus de plantas heterólogos con el fin de

conseguir un sistema que infecta fácilmente una amplia gama de tipos de plantas y aún así presenta poco o ningún riesgo de diseminación infecciosa. En determinadas realizaciones preferidas, este sistema incluye componentes del Virus del Mosaico de Alfalfa (AIMV) y Virus del Mosaico del Tabaco (TMV).

5 AIMV es un *Alfamovirus*, estrechamente relacionado con el grupo *Ilarvirus* y es un miembro de la familia *Bromoviridae*. El genoma de AIMV consiste en tres ARN de sentido positivo (ARN 1-3) (Véase la Figura 4, que presenta códigos de acceso para una variedad de secuencias del genoma de AIMV). Los ARN 1 y 2 codifican las proteínas replicasas P1 y P2, respectivamente; el ARN3 codifica la proteína de movimiento célula a célula P3. Se sintetiza un ARN subgenómico, ARN4, a partir de ARN3. Este ARN4 subgenómico codifica la proteína de cubierta viral (CP). CP participa en la activación del genoma viral para iniciar la infección, la replicación del ARN, el ensamblaje viral, estabilidad del ARN viral, movimiento a larga distancia del ARN viral y formación de síntomas. AIMV depende de una proteína P3 funcional para el movimiento célula a célula y requiere la proteína CP a lo largo de la infección. Dependiendo del tamaño del ARN viral encapsulado en CP, los viriones de AIMV pueden variar considerablemente de tamaño (por ejemplo, 30 a 60 nm de longitud y 18 nm de diámetro) y forma (por ejemplo, esférica, elipsoidal, o baciliforme). El rango de huéspedes de AIMV es extraordinariamente amplio e incluye los cultivos agrícolas valiosos alfalfa (*Medicago sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (*Lactuca sativa*), judía común (*Phaseolus vulgaris*), patata (*Solanum tuberosum*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y soja (*Glycine max*). Las especies huésped susceptibles particulares incluyen, por ejemplo, *Abelmoschus esculentus*, *Ageratum conyzoides*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus retroflexus*, *Antirrhinum majus*, *Apium graveolens*, *Apium graveolens* var *rapaceum*, *Arachis hypogaea*, *Astragalus glycyphyllos*, *Beta vulgaris*, *Brassica campestris* ssp. *rapa*, *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Caryopteris incana*, *Catharanthus roseus*, *Celosia argentea*, *Cheiranthus cheiri*, *Chenopodium album*, *Chenopodium anzaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Cicer arietinum*, *Cichorium endiva*, *Coriandrum sativum*, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Daucus carota* (var. *sativa*), *Dianthus barbatus*, *Dianthus caryophyllus*, *Emilia sagittata*, *Fagopyrum esculentum*, *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus*, *Lablab purpureus*, *Lathyrus odoratus*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Lupinus albus*, *Macroptilium lathyroides*, *Malva parviflora*, *Matthiola incana*, *Medicago hispida*, *Melilotus albus*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Petunia x hybrida*, *Phaseolus lunatus*, *Philadelphus*, *Physalis floridana*, *Physalis peruviana*, *Phytolacca americana*, *Pisum sativum*, *Solanum demissum*, *Solanum melongena*, *Solanum nigrum*, *Solanum nodiflorum*, *Solanum rostratum*, *Sonchus oleraceus*, *Spinacia oleracea*, *Stellaria media*, *Tetragonia tetragonoides*, *Trifolium dubium*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium subterraneum*, *Tropaeolum majus*, *Viburnum opulus*, *Vicia faba*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* y *Zinnia elegans*.

35 TMV es el miembro tipo del grupo tobamovirus. Los tobamovirus tienen genomas de ARN monocatenario (+), y producen viriones en forma de varilla que consisten en el genoma de ARN y polipéptidos de la proteína de cubierta (CP). Los genomas de los tobamovirus codifican 4-5 polipéptidos. Dos de los polipéptidos se traducen desde el mismo codón de inicio cerca de 5' y funcionan en la replicación viral. Estos polipéptidos incluyen una ARN polimerasa dependiente de ARN. Además, típicamente son codificados los polipéptidos que tienen actividad metiltransferasa y ARN helicasa. Las otras proteínas codificadas incluyen típicamente una proteína de movimiento y la proteína de la cubierta, cada una de los cuales se traduce a partir de un ARN subgenómico separado. Los ejemplos representativos de genomas de tobamovirus se representan en la Figura 1.

45 El genoma de TMV tiene una longitud de 6.395 nucleótidos y está encapsidado con una CP de 17,5 kD, que produce varillas de 300 nm de largo. Además de CP, TMV tiene tres proteínas no estructurales: las proteínas de 183 y 126 kD se traducen a partir de ARN genómico y se requieren para la replicación viral. La proteína de movimiento de 30 kD proporciona la transferencia de ARN viral de célula a célula. Una lista representativa de códigos de acceso para la información sobre la secuencia del genoma de TMV se incluye como Figura 2; los Apéndices B-F muestran alineamientos de secuencia para la los genes de tobamovirus de helicasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (una replicasa), proteína de movimiento, proteína de cubierta, y metiltransferasa, respectivamente, de varios tobamovirus. Las especies de planta susceptibles de infección con TMV incluyen *Beta vulgaris*, *Capsicumfrutescens*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium hybridum*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Papaver nudicaule*, *Phaseolus vulgaris*, *Physalis floridana*, *Physalis peruviana* y *Solanum tuberosum*.

55 Según determinadas realizaciones de la presente invención, se genera una versión competente para la replicación bien de AIMV o TMV que carece de movilidad a larga distancia pero que incluye un polinucleótido que se va a expresar en los tejidos de planta, preferentemente bajo el control del promotor de CP (por ejemplo, en lugar del gen CP, de manera que CP no es funcional) como el vector productor. Si las plantas se inoculan con este vector solo, su infección está limitada a tejidos locales (es decir, a células en la hoja inicialmente infectada).

60 Este vector productor competente para la replicación se administra junto con un vector vehicular separado que porta una CP funcional. Preferentemente, los transcritos de estos dos vectores se mezclan entre sí y se aplican mecánicamente a las hojas de la planta. En otras realizaciones de la invención descritas en la descripción detallada, el vector vehicular es incompetente para la replicación de manera que no resulta una infección sistémica. El vector

productor se replica y proporciona replicasa para trans-replicación del vector vehicular defectuoso para la replicación. La replicación de (infección con) el vector productor resulta en la producción del producto de expresión del polinucleótido. La replicación del vector vehicular proporciona CP, que apoya el movimiento de ambos vectores a las hojas superiores no inoculadas. Preferiblemente, se evita la integración de los vectores en el genoma del huésped, de manera que no se producen plantas transgénicas, y se minimiza el riesgo de que las alteraciones genéticas se introduzcan en el medio ambiente.

Hemos construido un vector basado en el Virus del Mosaico del Tabaco que está adaptado para la inserción de un polinucleótido de interés para generar un vector productor según la presente invención. Específicamente, hemos generado vectores que son defectuosos en la producción de CP (véanse las Figuras 8 y 11; el vector D4 se representa con un polinucleótido genérico insertado: el vector SR-27 y los vectores relacionados derivan de D4 como se describe adicionalmente en el Ejemplo 4). Hemos demostrado que la infección con dichos vectores se limita a hojas inoculadas localmente. Estos vectores dependen de un segundo vector para el movimiento sistémico.

Hemos usado un sistema de protoplastos para ensayar la replicación del vector, estabilidad dependiente de la replicación y eficacia de la producción de proteína. También hemos inoculado plantas de *Nicotiana benthamiana* para ensayar el movimiento célula a célula y la estabilidad del vector, y hemos demostrado infección sistémica cuando este vector se administra junto con un vector AIMV de tipo salvaje incluyendo un gen CP de AIMV.

Se ha construido un vector basado en AIMV referido como Av/A4, que contiene un gen de la proteína de cubierta funcional de AIMV. Como se muestra en la Figura 5, hemos establecido un sistema de protoplastos de tabaco y ensayado los componentes de este vector. Se representa una transferencia Western que muestra la acumulación de la proteína de cubierta del virus, indicando infección de protoplastos y verificando que somos capaces de detectar de manera fiable la expresión de CP en nuestro sistema de protoplastos.

Como se muestra en las Figuras 6 y 7, hemos infectado con éxito dos especies de plantas huésped, plantas de *Nicotiana benthamiana* y pimiento. La Figura 6 muestra las plantas infectadas; la Figura 7 muestra una transferencia Western de hojas superiores (no infectadas inicialmente) analizadas 12 días después de la inoculación. La proteína CP de AIMV es fácilmente detectable, lo que indica que somos capaces de detectar de manera fiable la expresión de CP en huéspedes de planta infectada.

Ejemplo 2: Expresión de un polinucleótido que codifica la hormona de crecimiento humana

La Figura 8 muestra dos vectores basados en TMV, 125C y D4, que se prepararon por ingeniería para aceptar la inserción de un polinucleótido de interés, después de la inserción del polinucleótido (indicado como "gen extraño"). 125C incluye secuencias de la proteína de cubierta de TMV (es decir, secuencias que se extienden aguas abajo del nucleótido 5.757 del genoma de TMV) que contienen un elemento en *cis* que puede requerirse para una replicación óptima. Insertamos el gen para la hormona de crecimiento humana (hGH) en cada uno de estos vectores entre los sitios *Pac1* y *Xho1*. Se introdujo un AUG en el cebador 5' usado para amplificar el gen de un plásmido, y los aminoácidos KDEL se introdujeron en el extremo 3' de la secuencia codificadora con el fin de aumentar la traducción debido a retención en el ER. hGH se clonó con y sin su secuencia líder nativa; hGH2 carece de líder y hGH4 incluye el líder.

El cebador SR22 (5'-CCG **TTAATTAATG** TTC CCA ACT ATT CCA) se usó para clonar hGH sin su líder, e introduciendo un sitio *Pac1* en el extremo 5'; el cebador SR23 (5'-CCG **TTAATTAATG** GCA ACT GGA TCA AGG) se usó para clonar hGH con su líder. El cebador SR24 (5'-CCG **CTC GAG** TTA AAA ACC ACA TGA) se usó para clonar el gen de hGH sin KDEL e introducir un sitio *Xho1* en el extremo 3'; el cebador SR25 (5'-CCG **CTC GAG** TTC ATC TTT AAA ACC TGA TCC) se usó para clonar el gen con KDEL.

Los transcritos *in vitro* de las construcciones de vector 125C incluyendo hGH se prepararon linearizando aproximadamente 20 ug de ADN en 100 uL de volumen. El grado de linearización se evaluó por electroforesis en gel de una muestra de 2 uL. El ADN linearizado se limpió usando un kit de purificación PCT, del que se eluyó en 50 uL. Se preparó una mezcla de transcripción en un volumen de 25 uL con 2,5 uL de tampón T7 10x, 2,5 uL de 100 mM DTT, 0,5 uL de RNAsin (Promega), 1,25 uL de mezcla de NTP (20 mM A, C, U; 2 mM G; Pharmacia-Amersham); 1,25 uL Cap (5 mM trifosfato de diguanosina; Pharmacia-Amersham) y 4 uL de 25 mM MgCl₂. La mezcla se calentó hasta 37°C durante 1 minuto. Se añadieron 1,5-2 ug de ADN en 12 uL de agua, y la combinación se calentó a 37°C durante 2 minutos. Se añadió 1 uL de T7 polimerasa (50 U/uL; New England Biolabs), y la reacción se incubó durante 15 minutos. Se añadieron 2 uL de 12,5 mM GTP tocando la punta de una pipeta con el líquido (no pipetear arriba y abajo). La reacción se incubó a 37°C durante 1h 15 minutos. Se visualizó una alícuota de 2,5 uL en un gel; el resto se congeló.

Las construcciones resultantes se ensayaron tanto en un sistema de protoplastos como en plantas intactas. Se inocularon protoplastos de tabaco con cada uno de los diferentes transcritos mediante electroporación (es decir, las plantas se inocularon con transcritos de construcciones individuales, no con una combinación de diferentes transcritos). Las hojas de las plantas se inocularon diluyendo la reacción de transcripción mediante la adición de 25 uL de agua y 50 uL de FES. Las plantas fueron espolvoreadas con polvo de carborundo que actúa como un abrasivo. Se frotaron suavemente alícuotas de 25 uL de la reacción de transcripción/disolución de FES en la

superficie de cada una de dos hojas. Las plantas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento a 21°C bajo condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

5 Los protoplastos en suspensión de *Nicotiana tabacum* se recogieron a dos puntos de tiempo. 24 y 48 horas después de la inoculación, de manera que cada alicuota contenía 500.000 protoplastos. Se usaron aproximadamente 2 millones de protoplastos por inoculación de 25 uL de transcrito. Los protoplastos se sedimentaron por centrifugación y el sedimento se resuspendió en 50 uL de tampón (una mezcla de tampón de extracción de proteínas de Bradley y tampón de carga de Laemmli). Las muestras (10 uL) se analizaron por PAGE seguido de análisis de hibridación por transferencia Western usando antisuero frente a hGH de pollo y anti-IgG de pollo conjugada con fosfatasa alcalina. La hGH estándar se corrió como un estándar. NBT-BCIP se usó para revelar las transferencias. La Figura 9 muestra los resultados del experimento.

Los resultados indican que se obtuvo un mayor rendimiento de hGH a partir de los protoplastos en suspensión de tabaco a las 24h que a las 48h después de la inoculación. La posición de la banda correspondiente a hGH de protoplastos infectados indica un peso molecular ligeramente mayor que la hGH estándar. Esto podría ser debido a la secuencia KDEL unida al extremo 3' de la proteína hGH.

15 Las plantas de *Nicotiana benthamiana* también se inocularon con transcritos *in vitro*, y las plantas se monitorizaron para la producción de hGH. No pudo detectarse ninguna señal específica para la proteína a 5 dpi, aunque a 11 dpi pudimos detectar una señal para hGH en las hojas superiores de plantas inoculadas (Figura 10).

Ejemplo 3: Expresión transitoria de un transgén de insulina humana

20 Hemos preparado construcciones para expresar insulina y proinsulina en plantas usando nuestros vectores de expresión transitoria basados en virus de plantas D4 y 125C. Se usaron los cebadores siguientes para clonar proinsulina en 125C y D4, basándonos en los sitios *Pac1* y *Xho1* para la clonación, y añadiendo KDEL en el extremo 3' de cada péptido:

1) Sitio *Pac1* en el extremo 5' del ORF de la insulina (péptido B):

SR30 5'-cgg tta att aatg ttt gtt aat caa cat-3'

25 2) Sitio *Xho1* en el extremo 3' del péptido A con KDEL

SR31 5'-cgg ctc gag tca gag ttc ate ttt gtt aca gta gtt ctc aag-3'

Ejemplo 4: Co-infección y complementación cruzada de vectores virales

Este ejemplo demuestra que un vector de expresión basado en TMV defectuoso en la proteína de cubierta puede complementarse con un vector AIMV que suministra CP en *trans*.

30 D4C3GFP es un vector de expresión basado en TMV que es defectuoso en la producción de CP (Shivprasad et al., 1999: TTT-GFP) como resultado de la delección de la región codificadora de CP de TMV y su reemplazo con el gen C3GFP, que se pone bajo el control del promotor subgenómico TMVCP (véase la Figura 11b). El gen C3GFP se reclonó en D4 por PCR de superposición para eliminar los sitios *Nco1* y *Xho1* en la secuencia de nucleótidos de C3GFP para facilitar etapas adicionales de clonación. Se introdujo un policonector *PstI-NotI-XhoI* en el extremo 3' del gen C3GFP. El producto de PCR digerido con *PacI-XhoI* se clonó en D4 resultando en la versión de D4C3GFP mostrada en la Figura 11c.

Los cebadores que usamos para modificar el gen C3GFP y eliminar los sitios *Nco1* y *Xho1* son:

1) C3GFP.*Pac1*.Dir (N)

GGGAG.ATCTT.AATTA.ATGGC.TAGCA.AAGGA.GAAGA.A 36nt

40 2) C3GFP.*Xho1*.Inv(N)

CCCCT.CGAGC.GGCCG.CTGCA.GTTAT.TTGTA.GAGCT.CATCC.ATGCC 45nt

3) C3GFP.*Nco1*.Dir

GTTCC.CTGGC.CAACA.CTTGT.CAC 23nt

4) C3GFP.*Nco1*.Inv

45 TAGTG.ACAAG.TGTTG.GCCAG.GG 22nt

5) C3GFP.*Xho1*.Dir

GGACA.CAAAC.TGGAG.TACAA.CTATA 25nt

6) C3GFP.Xho1.Inv

AGTTA.TAGTT.GTACT.CCAGT.TTGTG

25nt

7) (BglII)-Pacl

>AUG...HindIII...NcoI...NdeI...BsrGI...MluI...XhoI...BamHI...MfeI(MunI)...S all...Sacl...TAA< PstI...NotI...XhoI

5 Se generaron tres construcciones que contenían la longitud completa o partes de la región 3' no traducida (3' UTR) de ARN3 de AIMV. En cada una de estas construcciones, las secuencias que codifican C3GFP bajo el control del promotor subgenómico CP de TMV estaban presentes aguas arriba de las secuencias 3'-UTR de ARN3 de AIMV (bien de longitud completa o una parte de la UTR), para permitirnos identificar de manera precisa las secuencias de la 3' UTR de ARN3 de AIMV requeridas para el ensamblaje y movimiento del ARN genómico de TMV (bien en *trans* o en *cis*). Las secuencias de ARN3 se insertaron entre los sitios *Not1* y *Xho1* del nuevo vector D4C3GFP como fragmentos *Not1-Sal1*, resultando en las construcciones SR25 (nts 1.859-1.941 de ARN3), SR26 (nts.1.859-1.969) y SR27 (nts. 1.859-2.037) (Figura 11d). Además de las secuencias de 3' UTR de ARN3 de AIMV, SR25, SR26, y SR27 también incluyen secuencias de la 3' UTR de TMV (es decir, la UTR del transcrito genómico de TMV), aguas abajo de las secuencias insertadas de AIMV. Estas secuencias son los nucleótidos de TMV 6.192-6.395, como en la construcción D4. Los virus basados en TMV (SR25, SR26 y SR27) son defectuosos en el movimiento a larga distancia debido a que la proteína de cubierta de TMV es esencial para el transporte a larga distancia mediado por el floema e infección sistémica efectivos de TMV.

Los cebadores usados para generar las construcciones basadas en D4 con secuencias 3' UTR de ARN3 de AIMV fueron:

20 1) SR-52 cebador 5' con sitios *Xho1-Pst1* en el nt 1.859 (más sentido) 5'-CCGCTCGAGCTGCAGTGTACCCCA-TTAATTTGG-3'

2) SR-53 cebador 3' en el nt 1.941 de ARN3 de AIMV con sitios *Not1-Sal1*: menos sentido 5'-CGGGTCGAC-GCGGCCGCAATAGGACTTCATACCT-3'

25 3) SR-54 cebador 3' con sitios *Not1-Sal1* en el nt 1.969 de ARN3 de AIMV: menos sentido 5'-CGGGTCGAC-GCGGCCGCAATATGAAGTCGATCCTA-3'

4) SR-55 cebador 3' con sitios *Not1-Sal1* en el nt 2.037 (menos sentido) 5'-CGGGTCGACGCGGCCGCGCATCC-CTTAGGGGCATT-3'.

30 Los plásmidos resultantes fueron transcritos usando T7 polimerasa y los transcritos *in vitro* se usaron para inocular plantas de *Nicotiana benthamiana*. Se prepararon los transcritos *in vitro* de SR25, SR26, SR27, y una construcción de AIMV de tipo salvaje linearizando aproximadamente 20 ug de ADN en 100 uL de volumen. El grado de linearización se evaluó por electroforesis en gel de una muestra de 2 uL. El ADN linearizado se limpió usando un kit de purificación PCT, del que se eluyó en 50 uL. Se preparó una mezcla de transcripción en un volumen de 25 uL con 2,5 uL de tampón T7 10x, 2,5 uL de 100 mM DTT, 0,5 uL de RNAsin (Promega), 1,25 uL de mezcla de NTP (20 mM A, C, U, 2 mM G; Pharmacia-Amersham); 1,25 uL de Cap (5 mM trifosfato de diguanosina; Pharmacia-Amersham) y 4 uL de 25 mM MgCl₂. La mezcla se calentó hasta 37°C durante 1 minuto. Se añadieron 1,5-2 ug de ADN en 12 uL de agua, y la combinación se calentó a 37°C durante 2 minutos. Se añadió 1uL de polimerasa T7 (50 U/uL; New England Biolabs), y la reacción se incubó durante 15 minutos (construcciones SR25, SR26, SR27) ó 2 horas (construcción AIMV). Se añadieron 2 ul de 12,5 mM GTP tocando la punta de la pipeta con el líquido (no pipetear arriba y abajo) La reacción se incubó a 37°C durante 1h 15 minutos (construcciones (SR25, SR26, SR27) ó 30 minutos (construcción AIMV). Se visualizó una alícuota de 2,5 uL en un gel; el resto se congeló.

45 Las hojas de las plantas se inocularon con SR25, SR26 o SR27 diluyendo la reacción de transcripción mediante la adición de 25 uL de agua y 50 uL de FES. Las plantas se espolvorearon con polvo de carborundo que actúa como un abrasivo. Se frotaron suavemente alícuotas de 25 uL de la reacción de transcripción/disolución de FES en la superficie de cada una de dos hojas. Las plantas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento a 21°C bajo condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Dos semanas después de la inoculación, cuando SR25, SR26, SR27 se habían diseminado en las hojas inoculadas, lo que se visualizó exponiendo las plantas a luz ultravioleta de alta longitud de onda (366 nm), las mismas hojas se inocularon con transcritos AIMV de tipo salvaje como se describe para los vectores basados en TMV.

50 Dos semanas después de la infección con AIMV, pudo observarse fluorescencia difusa de GFP en las hojas superiores de las plantas infectadas con SR27 y AIMV pero no con SR25 o SR26 y AIMV. La Figura 12a muestra una fotografía de una planta que se co-inoculó con SR27 y AIMV. La imagen (tomada bajo luz UV) demuestra la diseminación del virus en las hojas superiores no inoculadas. La fluorescencia está causada por la acumulación de GFP. La Figura 12c muestra la misma planta que en la Figura 12a, bajo luz normal. La Figura 12b (tomada bajo luz UV) muestra una fotografía de una planta que se inoculó sólo con SR27. La ausencia de fluorescencia en las hojas superiores indica que la infección del virus estaba limitada a las hojas localmente inoculadas. Estos resultados

- indican que el virus basado en TMV defectuoso en CP (SR27) que contiene el transgén GFP se movió a través del floema a las hojas superiores con la ayuda de AIMV. Generalmente (por ejemplo, en ausencia de trans-complementación de otro virus) D4C3GFP sólo se mueve a las venas principales de las hojas superiores 40-45 d.p.i., y SR27 requiere periodos de tiempo similares o incluso mayores para moverse a las hojas superiores en este sistema. Este resultado indica que AIMV puede usarse como una fuente de la proteína de cubierta que complementará y permitirá el movimiento de un vector viral que es defectuoso en uno o más componentes de proteína de cubierta sistémicamente y proporciona la expresión de proteínas extrañas, incluyendo proteínas complejas tales como anticuerpos. Los componentes de complementación de CP pueden ser de virus relacionados (otros alfamovirus, ilarvirus, bromovirus) o no relacionados (TMV, CMV, etc.).
- 5
- 10 También se han generado construcciones relacionadas con SR27 pero que contienen el gen de hGH (descrito anteriormente en el Ejemplo 2) en lugar del gen que codifica GFP y están en el proceso de ser ensayadas.

Equivalentes

- Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando sólo experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. El alcance de la presente invención no se pretende que esté limitado a la Descripción anterior, sino que es como se muestra en las reivindicaciones siguientes.
- 15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fraunhofer USA Inc.

5 <120> Sistema para la Expresión de Genes en Plantas
 <130> 17441EPdiv1:nak
 <140>
 10 <141> 2005-02-02
 <150> 10/770.600
 <151> 2004-02-03

15 <160> 16
 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
 20 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> El cebador SR22 se usó para clonar hGH sin su líder, e introducir un sitio Pac1 en el extremo 5'.
 <400>1
 30 cggtaatta atgttcccaa ctattcca 28
 <210> 2
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> El cebador SR23 se usó ara clonar hGH con su líder.
 <400> 2

40 ttaattaatg gcaactggat caagg 25
 <210> 3
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> El cebador SR24 se usó para clonar el gen de hGH sin KDEL e introducir un sitio Xho1 en el extremo 3'.
 <400> 3
 cggctcgagt taaaaaccac atga 24

55 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> El cebador SR25 se usó para clonar el gen con KDEL.
 <400> 4

65 cggctcgagt tcattcttaa aacctgatcc 30

ES 2 531 125 T3

<210> 5
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

5
<220>
<223> Sitio Xho1 en el extremo 3' del péptido A con KDEL.

<400> 5

10
cggctcgagt cagagttcat cttgttaca gtagttctca ag 42

<210> 6
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

15
<220>
<223> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.

20
<400> 6

gggagatctt aattaatggc tagcaaagga gaagaa 36

25
<210> 7
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

30
<220>
<220> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.

<400> 7

35
cccctcgagc ggccgctgca gttattgta gagctcatcc atgcc 45

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

40
<220>
<223> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.

45
<400> 8

gtccctggc caacactgt cac 23

<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

50
<220>
<223> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.

<400> 9

60
tagtgacaag tgttgccag gg 22

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

65
<220>

<223> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.
 <400> 10

5 ggacacaaac tggagtacaa ctata 25
 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador usado para modificar GFP de Aequorea Victoria.

15 <400> 11

agttatagtt gtactccagt ttgtg 25

<210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Cebador relacionado con el virus del Mosaico de la Alfalfa.

<400> 12

30 ccgctcgagc tgcagtgta cccattaatt tgg 33
 <210> 13
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador relacionado con el virus del mosaico de la Alfalfa.

<400> 13

40 cgggtcgagc cggccgcaa taggactca tacct 35
 <210> 14
 <211> 35
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Cebador relacionado con el virus del mosaico de la Alfalfa.

<400> 14

cgggtcgagc cggccgcaat atgaagtcga tccta 35

55 <210> 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador relacionado con el virus del mosaico de la Alfalfa.

<400> 15

65 cgggtcgagc cggccgca tccttaggg gcatt 35

ES 2 531 125 T3

<210> 16
<211> 424
<212> PRT
<213> Tobamovirus/TMV-KR

5

<400> 16

ES 2 531 125 T3

Lys Gln Met Ser Ser Ile Val Tyr Thr Gly Pro Ile Lys Val Gln Gln
 1 5 10 15
 Met Lys Asn Phe Ile Asp Ser Leu Val Ala Ser Leu Ser Ala Ala Val
 20 25 30
 Ser Asn Leu Val Lys Ile Leu Lys Asp Thr Ala Ala Ile Asp Leu Glu
 35 40 45
 Thr Arg Gln Lys Phe Gly Val Leu Asp Val Ala Ser Arg Lys Trp Leu
 50 55 60
 Ile Lys Pro Thr Ala Lys Ser His Ala Trp Gly Val Val Glu Thr His
 65 70 75 80
 Ala Arg Lys Tyr His Val Ala Leu Leu Glu Tyr Asp Glu Gln Gly Val
 85 90 95
 Val Thr Cys Asp Asn Trp Arg Arg Val Ala Val Ser Ser Glu Ser Val
 100 105 110
 Val Tyr Ser Asp Met Ala Lys Leu Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Arg
 115 120 125
 Asn Gly Glu Pro His Val Ser Ser Ala Lys Val Val Leu Val Asp Gly
 130 135 140
 Val Pro Gly Cys Gly Lys Thr Lys Glu Ile Leu Ser Arg Val Asn Phe
 145 150 155 160
 Asp Glu Asp Leu Ile Leu Val Pro Gly Lys Gln Ala Ala Glu Met Ile
 165 170 175
 Arg Arg Arg Ala Asn Ser Ser Gly Ile Ile Val Ala Thr Lys Asp Asn
 180 185 190
 Val Lys Thr Val Asp Ser Phe Met Met Asn Phe Gly Lys Ser Thr Arg
 195 200 205
 Cys Gln Phe Lys Arg Leu Phe Ile Asp Glu Gly Leu Met Leu His Thr
 210 215 220
 Gly Cys Val Asn Phe Leu Val Thr Met Ser Leu Cys Glu Ile Ala Tyr
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Asp Thr Gln Gln Ile Pro Tyr Ile Asn Arg Val Ser Gly
 245 250 255
 Phe Pro Tyr Pro Ala His Phe Ala Lys Leu Glu Val Asp Glu Val Glu

ES 2 531 125 T3

			260					265					270			
Thr	Arg	Arg	Thr	Thr	Leu	Arg	Cys	Pro	Ala	Asp	Val	Thr	His	Tyr	Leu	
		275					280					285				
Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Gly	Phe	Val	Met	Ser	Thr	Ser	Ser	Val	Lys	Lys	
	290					295					300					
Ser	Val	Ser	Gln	Glu	Met	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Val	Ile	Asn	Pro	Ile	
305					310					315					320	
Ser	Lys	Pro	Leu	His	Gly	Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Thr	Gln	Ser	Asp	Lys	
				325					330					335		
Glu	Ala	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	Tyr	Ser	Asp	Val	His	Thr	Val	His	Glu	
			340					345					350			
Val	Gln	Gly	Glu	Thr	Tyr	Ser	Asp	Val	Ser	Leu	Val	Arg	Leu	Thr	Pro	
		355					360					365				
Thr	Pro	Val	Ser	Ile	Ile	Ala	Gly	Asp	Ser	Pro	His	Val	Leu	Val	Ala	
	370					375					380					
Leu	Ser	Arg	His	Thr	Cys	Ser	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	
385					390					395					400	
Pro	Leu	Val	Ser	Ile	Ile	Arg	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Ser	Tyr	Leu	
				405					410					415		
Leu	Asp	Met	Tyr	Lys	Val	Asp	Ala									
			420													

REIVINDICACIONES

1. Un método para expresar un polinucleótido de interés en una planta que comprende:
- (a) introducir un vector vehicular y vector productor en una planta, en el que:
- 5 (i) el vector vehicular incluye un primer polinucleótido de interés y el vector productor incluye un segundo polinucleótido de interés;
- (ii) el vector productor incluye un primer componente necesario para la expresión sistémica del primer polinucleótido de interés, y el vector vehicular carece del primer componente;
- (iii) el vector vehicular incluye un segundo componente necesario para la expresión sistémica del segundo polinucleótido de interés, y el vector productor carece del segundo componente; y
- 10 (iv) el primer y segundo componentes se seleccionan del grupo que consiste en un componente de proteína de cubierta funcional, un componente de replicasa funcional, y un componente de proteína de movimiento funcional, en el que el primer y segundo componentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: componentes de Bromoviridae y componentes de Tobamoviridae;
- (b) mantener la planta en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que el vector vehicular complemente el vector productor, y que el vector productor complemente el vector vehicular de manera que tanto el vector vehicular como el vector productor se muevan sistémicamente en la planta, y
- 15 (c) mantener la planta en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el primer y segundo polinucleótidos de interés se expresen en al menos algunas células de la planta.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que:
- 20 a) el vector vehicular incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional, o
- b) el vector vehicular incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional, o
- 25 c) el vector vehicular incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional, o
- d) el vector productor incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional, o
- 30 e) el vector productor incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional, o
- f) el vector productor incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector vehicular incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional.
- 40 4. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector vehicular incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional.
5. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector vehicular incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.
- 45 6. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector productor incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional.
- 50 7. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector productor incluye un componente de replicasa funcional

de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional.

5 8. Un método según la reivindicación 2, en el que el vector productor incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que el primer y segundo virus de planta son el mismo virus.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que el primer y segundo virus de planta son virus diferentes.

10 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en el que cada uno del primer y segundo virus de planta se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un bromovirus y un tobamovirus, y en el que el bromovirus es un alfamovirus, un virus del mosaico de la alfalfa o un ilarvirus y el tobamovirus es un virus del mosaico del tabaco.

15 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que cada uno del primer y segundo polinucleótidos de interés se selecciona independientemente del grupo que consiste en polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas, polinucleótidos que codifican una o más cadenas de anticuerpo, polinucleótidos que codifican proteínas nutricionalmente relevantes, y polinucleótidos que proporcionan un molde para la transcripción de una especie de ARN activa.

20 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en el que el al menos un componente de un segundo virus de planta comprende una parte no codificadora del genoma del segundo virus de planta.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la parte no codificadora comprende una región no traducida 5' ó 3' de un ARN viral.

15. Un kit para expresar polinucleótidos de interés en una célula de planta o planta completa, comprendiendo el kit un vector vehicular y un vector productor, en el que:

25 (i) el vector vehicular incluye un primer polinucleótido de interés y el vector productor incluye un segundo polinucleótido de interés;

(ii) el vector productor incluye un primer componente necesario para la expresión sistémica del primer polinucleótido de interés, y el vector vehicular carece del primer componente;

30 (iii) el vector vehicular incluye un segundo componente necesario para la expresión sistémica del segundo polinucleótido de interés, y el vector productor carece del segundo componente; y

(iv) el primer y segundo componentes se seleccionan del grupo que consiste en un componente de proteína de cubierta funcional, un componente de replicasa funcional, y un componente de proteína de movimiento funcional.

16. Un kit según la reivindicación 15, en el que:

35 el vector vehicular incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional, o el vector vehicular incluye un componente de proteína replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína replicasa funcional, o

40 el vector vehicular incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional, o

45 el vector productor incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional; o el vector productor incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional, o el vector productor incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.

50 17. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector vehicular incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional.

18. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector vehicular incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional.
- 5 19. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector vehicular incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector productor incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.
20. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector productor incluye un componente de proteína de cubierta funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de cubierta funcional.
- 10 21. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector productor incluye un componente de replicasa funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de replicasa funcional.
- 15 22. Un kit según la reivindicación 16, en el que el vector productor incluye un componente de proteína de movimiento funcional de un primer virus de planta, y el vector vehicular incluye al menos un componente de un segundo virus de planta, pero carece de un componente de proteína de movimiento funcional.

FIGURA 1

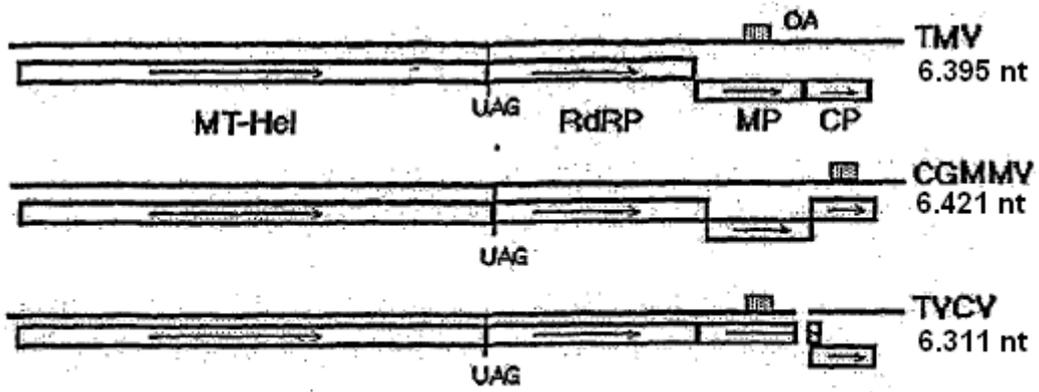


FIGURA 2

- [D13367](#) Gb(84)_vi:MTVCP Gen CP del virus del mosaico del tabaco. 7/94 474pb.
- [D13438](#) Em(40)_vi:MTVGRNA Gb(84)_vi:MTVGRNA ARN genómico del virus del mosaico del tabaco. 12/93 6.507pb.
- 5 • [D17458](#) Em(40)_vi:MTV30KP Gb(84)_vi:MTV30KP ARN del virus del mosaico del tabaco (TMV) para proteína 30K, cds completa. 3/94 795pb.
- [D38444](#) Em(44)_vi:Mtveg Gb(90)_vi:Mtvcg ARN del virus del mosaico del tabaco.10/94 6.303pb.
- [J02412](#) Em(40)_vi:TO30KOM Gb(84)_vi:MTV30KOM gel de proteína 30K del virus del mosaico del tabaco. 4/90 961pb.
- 10 • [J02413](#) Em(40)_vi:TOC30KCP Gb(84)_vi:MTV30KCP genes de proteína 30K y de cubierta del virus del mosaico del tabaco (cepa caupí). 4/90 1.800pb.
- [J02415](#) Gb(84)_vi:MTVVCG Virus del mosaico del tabaco (cepa vulgare), genoma completo. 9/88 6.395pb.
- [L11665](#) Em(40)_vi:MTVNGHYPE Gb(84)_vi:MTVNGHYPER ARN del virus del mosaico del tabaco. 8/93 6.506pb.
- [L35073](#) Gb(84)n:MTVCOATPRA Proteína de cubierta del virus del mosaico del tabaco, cds completa. 8/94 678pb.
- 15 • [L35074](#) Gb(84)n:MTVCOATPRO Proteína de cubierta del virus del mosaico del tabaco, cds completa. 8/94 680pb.
- [M19101](#) Em(40)_sy:AGVCHY Gb(84)_sy:SYNRMTVCHY ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/quimosina de ternera, promotor y extremo 5'. 7/89 101pb.
- [M19102](#) Em(40)_sy:AGVLSZ Gb(84)_sy:SYNRMTVLSZ ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/liosozima de pollo, promotor y extremo 5'. 7/89 107pb.
- 20 • [M19103](#) Em(40)_sy:AGVCAT Gb(84)_sy:SYNRMTVCAT ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/cloranfenicol transferasa de plásmido pJII2, líder y 5'.
- [M19104](#) Em(40)_sy:AGVNTP Gb(84)_sy:SYNRMTVNTP ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/neomicina fosfotransferasa II de plásmido pJII3, líder y
- 25 • [M19105](#) Em(40)_sy:AGVGUSA Gb(84)_sy:SYNVGUSA ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/beta-glucuronidasa de plásmido pJII 119, líder y extremo 5'. 7
- [M19106](#) Em(40)_sy:AGVGUSB Gb(84)_sy:SYNVGUSB ARNm recombinado del virus del mosaico del tabaco/beta-glucuronidasa de plásmido pJII 139, líder y extremo 5'. 7
- [M24809](#) Em(40)_vi:TOBMTVGT Gb(84)_vi:MTVGTAMV ARN del virus del mosaico del tabaco, extremo 3'. 2/90 72pb.
- 30 • [M24955](#) Em(40)_vi:MTVU1RAA Gb(84)_vi:MTVU1RAA ARN omega del virus del mosaico del tabaco (U1). 9/90 70pb.
- [M24992](#) Gb(84)_vi:MTVU2RAA ARN omega del virus del mosaico del tabaco (U2). 9/89 93pb.
- [V01405](#) Em(40)_vi:TOTMV1 Gb(84)_vi:TOTMV1 Región codificadora 5' del ARN del virus del mosaico del tabaco (TMV) (nucleótidos 69 a 236). 7/89 168pb.
- 35 • [V01407](#) Em(40)_vi:TOTMV3 Gb(84)_vi:TOTMV3 Dos genes del virus del mosaico del tabaco (proteína de viral de transporte y cubierta). 9/93 961 pb.
- [V01408](#) Em(40)_vi:TOTMV4 Gb(84)_vi:TOTMV4 Genoma del virus del mosaico del tabaco (variante 1). 7/83 6.395pb.
- [V01409](#) Em(40)_vi:TOTMV5 Gb(84)_vi:TOTMV5 Genoma del virus del mosaico del tabaco (variante 2). 7/83 6.398pb.
- 40 • [X00052](#) Em(40)_vi:TOTMV6 Gb(84)_vi:TOTMV6 Cepa común del virus del mosaico del tabaco (TMV) OM. Región 5' terminal. 6/85 275pb.
- [X00053](#) Em(40)_vi:TOTMV7 Gb(84)_vi:TOTMV7 Cepa del virus del mosaico del tabaco (TMV) L. Región 5' terminal. 6/85 278pb.

FIGURA 2 (continuación)

- X02144 Em(40)_vi:TOTMV8 Gb(84)_vi:TOTMV8 Genoma de la cepa del virus del mosaico del tabaco (L). 9/93 6.384pb.
- 5 • X66047 Em(40)_vi:TMV54KDA Gb(84)_vi:TMV54KDA ARN del Virus del Mosaico del Tabaco para proteína de 54 kDa. 6/92. 1.566pb.
- X68110 Em(40)_vi:TMVCG Gb(84)_vi:TMVCG Virus del mosaico del tabaco, genoma completo. 10/92 6.395pb.
- X70882 Em(40)_vi:TMVPM2CP Gb(84)_vi:TMVM2CP ARNm PM2 del virus del mosaico del tabaco para proteína de la cápside. 7/93 765pb.
- 10 • X70883 Em(40)_vi:TMVDT1CP Gb(84)_vi:TMVDT1CP ARNm DT1 del virus del mosaico del tabaco para proteína de la cápside. 7/93 765pb.
- X70884 Em(40)_vi:TMVDT2CP Gb(84)_vi:TMVDT2CP ARNm DT2 del virus del mosaico del tabaco para proteína de la cápside. 7/93 763pb.
- X70885 Em(40)_vi:TMVDT1GCP Gb(84)_vi:TMVDT1GCP ARNm DT1G del virus del mosaico del tabaco para proteína de la cápside. 7/93 763pb.
- 15 • Z29370 Em(40)_vi:TMVRPTPCP Gb(84)_vi:TMVRPTPCP ARN genómico del virus del mosaico del tabaco (crucífero) para ARN polimerasa dependiente de ARN; proteína 122K.
- M25782 Em(43)_vi:SIICp Gb(89)_vi:SIICp ARN de la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco satélite, cds completo. 11/94 1.058pb.

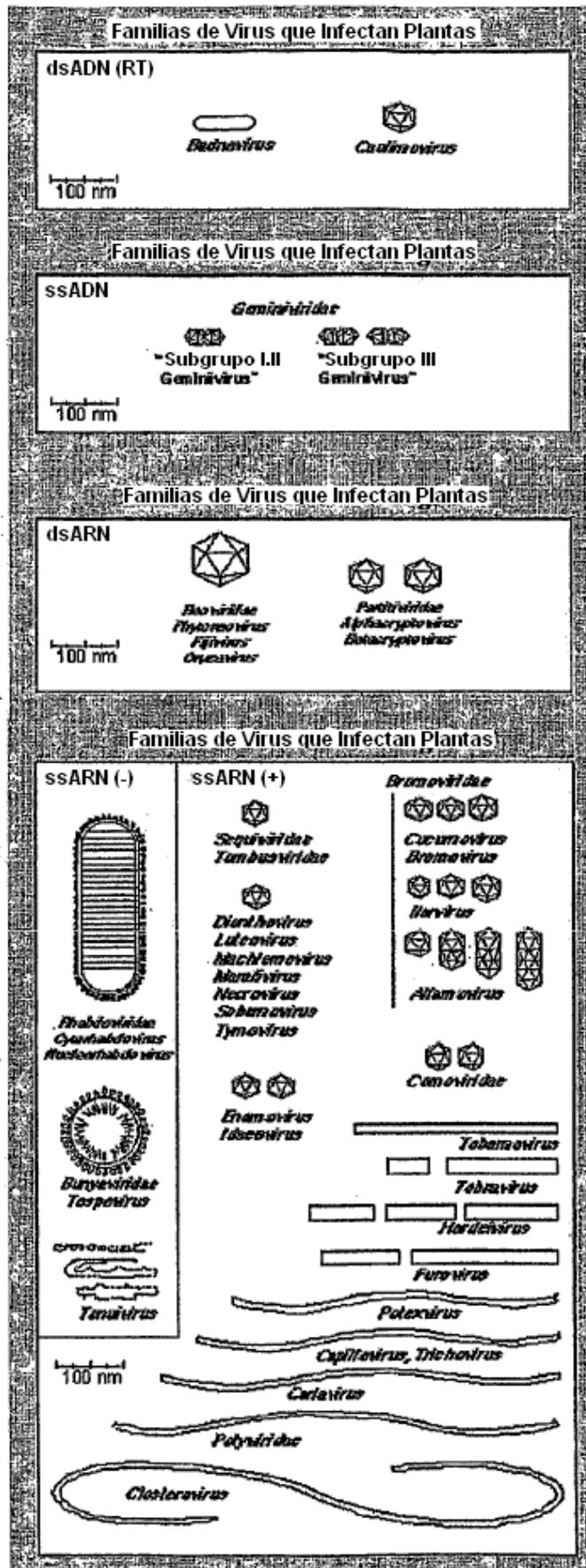


Figura 3

FIGURA 4

- J02001 Gb(84)_vi:MAARNA23 Extremo 3' del ARN2 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa Q). 2/85 228pb.
- J02003 Em(40)_vi:ALRNA3 GB(84)_vi:MAARN3 ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa secuencia líder de la proteína 35kd. 4/90 318pb.
- 5 • J02005 Gb(84)_vi:MAARNA35 ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa 425) extremo 5'. 2/85 101pb.
- K02702 Gb(84)_vi:MAACG2Z ARN2 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa 425 Leiden) del genoma completo. 9/88 2.593pb.
- K02703 Em(40)_vi:ALMRNA3 Gb(84)_vi:MAACG3Z ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa 425 Madison) del genoma completo. 4/90 2.037pb.
- 10 • K03542 Em(40)_vi:MAARNA3L Gb(84)_vi:MAARNA3L ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa que codifica la proteína de cubierta viral, completa. B. 4/90 2.142pb.
- L00161 Gb(84)_vi:MAARNA33 ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa Q), extremo 3'. 8/86 230pb.
- L00162 Em(40)_vi:ALMAARNA4 Gb(84)_vi:MAARN4 ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa 425 Leiden) que codifica la proteína de cubierta viral. 5/94 964pb.
- 15 • L00163 Em(40)_vi:ALMAACG1Z Gb(84)_vi:MAACG1Z ARN1 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa 425 Leiden) de genoma completo. 5/94 3.644pb.
- L00164 Gb(84)_vi:MAARNA13 ARN1 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa Q). 8/86 226pb.
- M10826 Em(40)_vi:MAARNA01 Gb(84)_vi:MAARNA4A ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa, (AIMV), fragmento 3' terminal 29C. 7/91 91pb.
- 20 • M10851 Em(40)_vi:MAARNA4A Gb(84)_vi:MAARNA4AX ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa, región 5' terminal. 7/89 74pb.
- M25004 Em(40)_vi:ALMAARNAA Gb(84)_vi:MAARNAA ARN3 ó 4 del virus del mosaico de la alfalfa, extremo 3'. 4/92 113pb.
- 25 • M25005 Em(40)_vi:ALMAARNAB Gb(84)_vi:MAARNAB ARN2 del virus del mosaico de la alfalfa, extremo 3'. 4/92 103pb.
- M25006 Em(40)_vi:ALMAARNAC Gb(84)_vi:MAARNAC ARN1 del virus del mosaico de la alfalfa, extremo 3'. 4/92 110pb.
- M25452 Em(40)_vi:ALMAARNA1 Gb(84)_vi:MAARNA4D Fragmento de ARN de ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa. 4/92 62pb.
- 30 • M35975 Em(40)_vi:ALMAARNA Gb(84)_vi:MAARNA1A Extremo 5' de ARN-1 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-S). 12/90 163pb.
- M35976 Em(40)_vi:ALMAAR01 Gb(84)_vi:MAARNA1B Extremo 5' de ARN-1 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-B). 12/90 115pb.
- 35 • M36389 Em(40)_vi:ALMAAR02 Gb(84)_vi:MAARNA2A Extremo 5' de ARN-2 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-S). 12/90 108pb.
- M36390 Em(40)_vi:ALMAAR03 Gb(84)_vi:MAARNA2B Extremo 5' de ARN-2 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-B). 12/90 109pb.
- M36391 Em(40)_vi:ALMAAR04 Gb(84)_vi:MAARNA3B Extremo 5' de ARN-3 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-S). 12/90 305pb.
- 40 • M36392 Em(40)_vi:ALMAAR05 Gb(84)_vi:MAARNA3C Extremo 5' de ARN-3 del virus del mosaico de la alfalfa (cepa AIMV-B). 12/90 290pb.
- M59241 Em(40)_vi:ALMAA32K Gb(84)_vi:MAA32KDMP ARN de la proteína de movimiento de 32kDa y proteína de cubierta del virus del mosaico de la alfalfa, cds completo. 8/92 2.188pb.
- 45 • S55890 Em(40)_vi:S55890 Gn(84)_vi:S55890 ARN-3 homólogo de proteína de cubierta, ARN-3 de homólogo de proteína 32K del virus del mosaico de la alfalfa (ARN-2) (virus de la frambuesa enana arbustiva, ARN Genómico,

ES 2 531 125 T3

2.231 nt).

- U12509 Em(43)_vi:Am12509 Gn(89)_vi:Amu12509 ARNm de proteína de cubierta ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa NZ1, cds completo. 8/94 876pb.
- 5 • U12510 Em(43)_vi:Am12510 Gn(89)_vi:Amu12510 ARNm de proteína de cubierta ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa NZ2, cds completo. 8/94 876pb.
- V00044 Em(40)_vi:ALALM1 Gb(84)_vi:ALALM1 Extremo 5' del ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. 5/94 61pb.
- V00045 Em(40)_vi:ALALM2 Gb(84)_vi:ALALM2 Extremo 5' del ARN 2 del virus del mosaico de la alfalfa. 5/94 13pb.
- 10 • V00046 Em(40)_vi:ALALM3 Gb(84)_vi:ALALM3 Extremo 5' del ARN 3 del virus del mosaico de la alfalfa. 5/94 101pb.
- V00047 Em(40)_vi:ALALM4 Gb(84)_vi:ALALM4 Unión intercistrónica en ARN3 del virus del mosaico de la alfalfa. 5/94 122pb.
- 15 • V00048 Em(40)_vi:ALALM5 Gb(84)_vi:ALALM5 ARN4 del virus del mosaico de la alfalfa que codifica la proteína de cubierta. 5/94 881pb.
- V00049 Em(40)_vi:ALALM6 Gb(84)_vi:ALALM6 Extremo 3' del ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. 7/91 226pb.
- V00050 Em(40)_vi:ALALM7 Gb(84)_vi:ALALM7 Extremo 3' del ARN 2 del virus del mosaico de la alfalfa. 7/91 228pb.
- 20 • V00051 Em(40)_vi:ALALM8 Gb(84)_vi:ALALM8 Extremo 3' del ARN 3 del virus del mosaico de la alfalfa. 7/91 230pb.
- V00052 Em(40)_vi:ALAM01 Gb(84)_vi:ALAM01 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 8
- 25 • V00053 Em(40)_vi:ALAM02 Gb(84)_vi:ALAM02 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 6
- V00054 Em(40)_vi:ALAM03 Gb(84)_vi:ALAM03 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 4
- V00055 Em(40)_vi:ALAM04 Gb(84)_vi:ALAM04 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 4
- 30 • V00056 Em(40)_vi:ALAM05 Gb(84)_vi:ALAM05 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 4
- V00057 Em(40)_vi:ALAM06 Gb(84)_vi:ALAM06 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 3
- 35 • V00058 Em(40)_vi:ALAM07 Gb(84)_vi:ALAM07 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 3
- V00059 Em(40)_vi:ALAM08 Gb(84)_vi:ALAM08 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 3
- V00060 Em(40)_vi:ALAM09 Gb(84)_vi:ALAM09 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 2
- 40 • V00061 Em(40)_vi:ALAM10 Gb(84)_vi:ALAM10 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 2
- V00062 Em(40)_vi:ALAM11 Gb(84)_vi:ALAM11 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 25
- 45 • V00063 Em(40)_vi:ALAM12 Gb(84)_vi:ALAM12 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 19
- V00064 Em(40)_vi:ALAM13 Gb(84)_vi:ALAM13 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa.

ES 2 531 125 T3

(Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 19

- V00065 Em(40)_vi:ALAM14 Gb(84)_vi:ALAM14 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 18
- 5 • V00066 Em(40)_vi:ALAM15 Gb(84)_vi:ALAM15 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 18
- V00067 Em(40)_vi:ALAM16 Gb(84)_vi:ALAM16 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa A). 5/94 15
- V00068 Em(40)_vi:ALAM17 Gb(84)_vi:ALAM17 Fragmento de ARN 1 del virus del mosaico de la alfalfa. (Obtenido después de digestión con ribonucleasa T1). 5/94 9
- 10 • X00819 Em(40)_vi:ALAM19 Gb(84)_vi:ALAM19 Secuencia de ARN 3 completo del virus del mosaico de la alfalfa (cepa S). 9/93 2.055pb.
- X01572 Em(40)_vi:A1MVRNA2 Gb(84)_vi:A1MVRNA2 ARN2 del virus del mosaico de la alfalfa (A1M4). 7/91 2.593pb.
- 15 • M28374 Em(43)_vi:Maatbts7a Gb(89)_vi:Maatbts7a ARN3 del mutante sensible a temperatura Tbts7 del virus del mosaico de la alfalfa (clon 143) (codifica proteína de cubierta
- M28375 Em(43)_vi:Maatbts7b Gb(89)_vi:Maatbts7b ARN3 del mutante sensible a temperatura Tbts7 del virus del mosaico de la alfalfa (clon 112) (codifica proteína de cubierta), fragmento del extremo 5'.

FIGURA 5

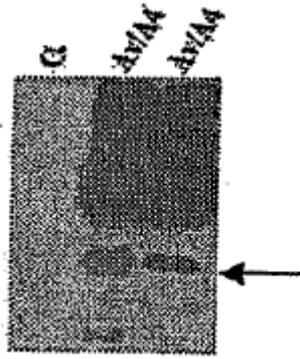


FIGURA 6



Plantas de pimiento



N. benthamiana

FIGURA 7

C- Av/A4
Hojas infectadas sistémicamente

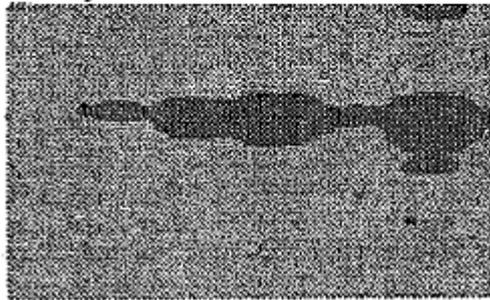


FIGURA 8

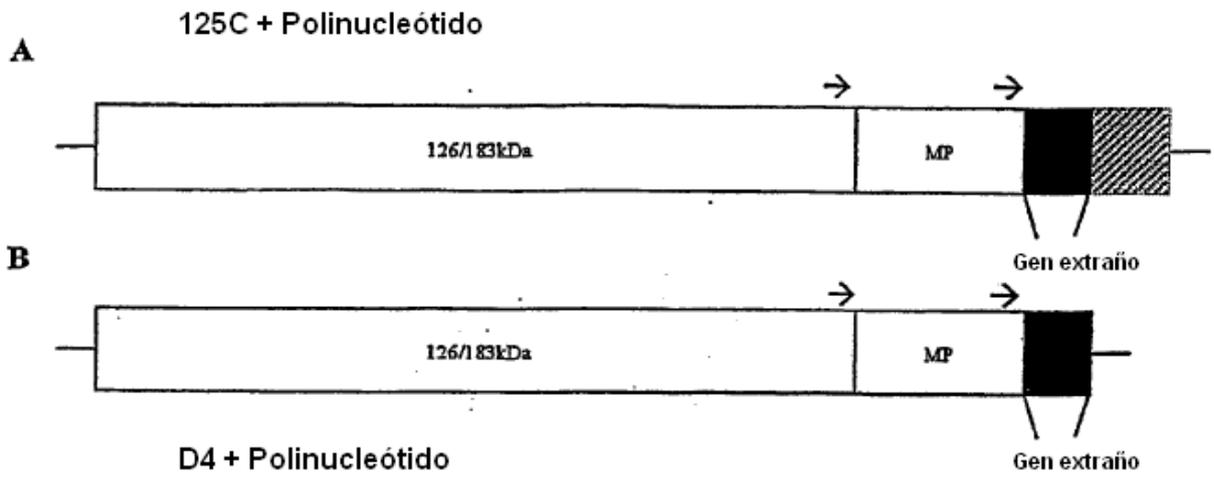


FIGURA 9

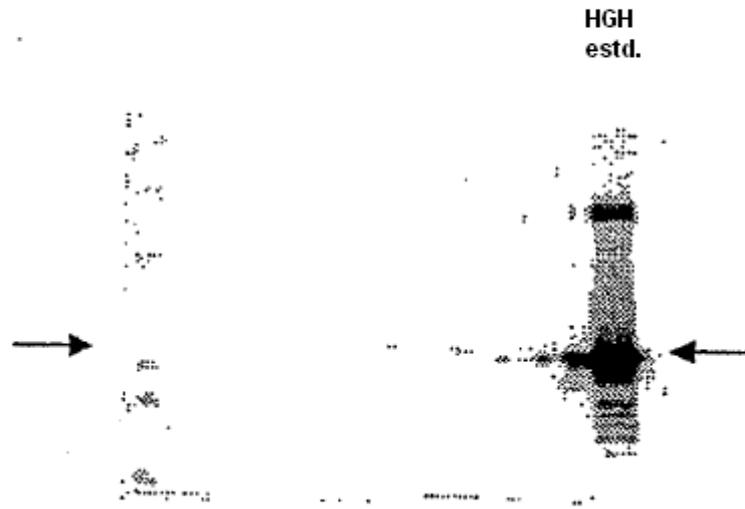


FIGURA 10



FIGURA 11

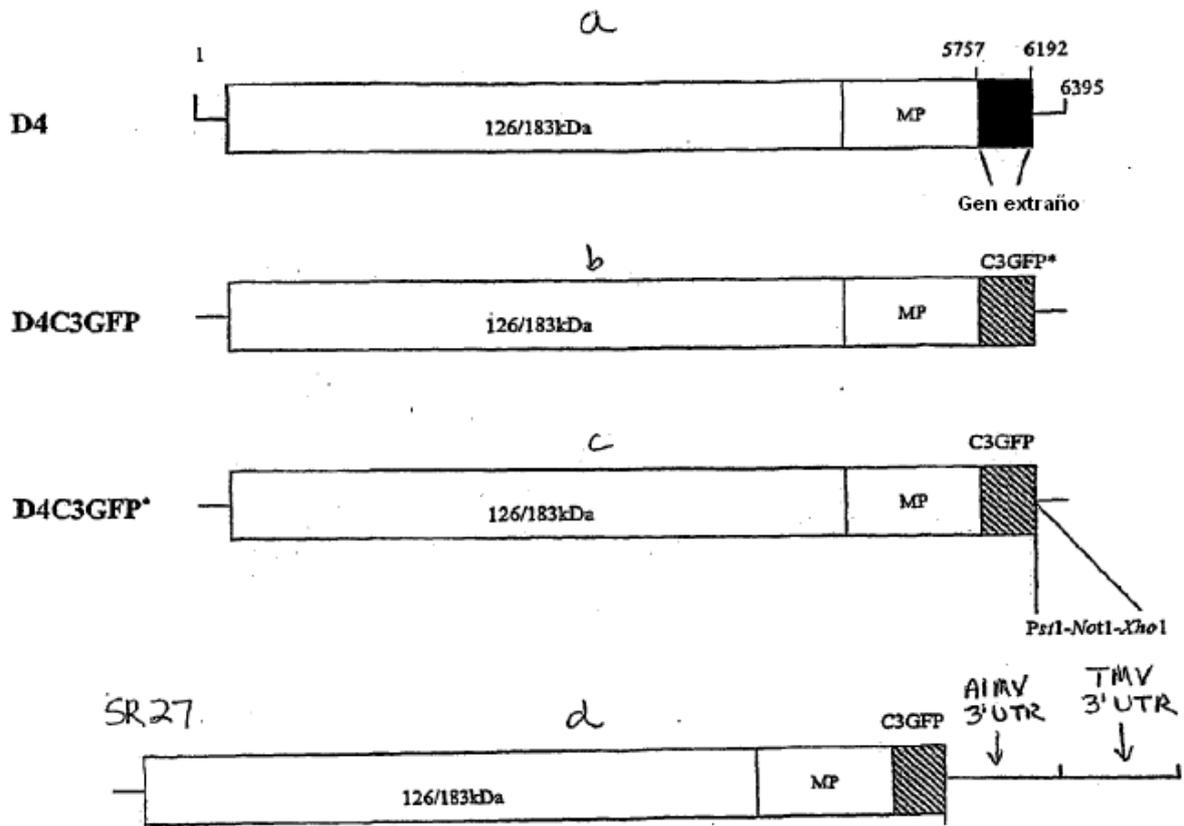


FIGURA 12

