

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 609**

51 Int. Cl.:

C12N 5/14 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A01H 5/06 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2005 E 05723389 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1769068**

54 Título: **Sistemas y métodos para expresión clonales en plantas**

30 Prioridad:

20.02.2004 US 546339 P

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

30.03.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YUSIBOV, VIDADI y
SKARJINSKAIA, MARINA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 609 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

Sistemas y métodos para expresión clonales en plantas.

5 Remisión a una Solicitud Afín

Esta solicitud reivindica prioridad para y el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente U.S. No. 60/546339 presentada el 20 de febrero de 2004.

10 Antecedentes de la Invención

La investigación para identificar moléculas con potencial para uso preventivo y terapéutico (anticuerpos, enzimas, hormonas y antígenos de vacuna) es de importancia primordial para la salud y la medicina. Históricamente, muchas de estas moléculas se recuperaron de fuentes humanas o animales. Sin embargo, las bajas cantidades de producto diana en el material originario asociadas con costes enormes, y lo que es más importante, la seguridad, han limitado la disponibilidad de principios terapéuticos y vacunas para prevención y tratamiento de muchas enfermedades en todo el mundo.

A mediados de los años 1970, la tecnología del DNA recombinante revolucionó el proceso e hizo posible la producción de moléculas diana predominantemente en sistemas de expresión bacterianos. Aunque los sistemas de expresión procariontes continúan siendo un método ampliamente utilizado para producción de proteínas recombinantes, esta plataforma tiene sus limitaciones debido, por ejemplo, a la ausencia de modificaciones posteriores a la traducción en eucariotas y el plegado inadecuado de muchas proteínas humanas complejas. Durante las tres últimas décadas muchos laboratorios de investigación han enfocado sus intereses en el desarrollo de sistemas alternativos para expresión de proteínas recombinantes que pudieran contrarrestar los inconvenientes de los sistemas bacterianos. Resultantes de estos estudios fueron los sistemas de cultivo de células animales y de insectos. Aunque cierto número de productos tales como anticuerpos monoclonales, vacunas y principios terapéuticos se han producido utilizando estos sistemas, sin embargo el elevado coste de producción combinado con el requerimiento de instalaciones de fabricación sumamente complejas para cada proteína diana motivó la investigación de sistemas de producción diferentes.

En los últimos años, se han utilizado cada vez más las plantas como sistema hospedador para la expresión de proteínas recombinantes. Dicha expresión puede realizarse, por ejemplo, sea por integración del gen de interés en un genoma de planta, para crear una planta transgénica que exprese de manera estable la proteína deseada, o por introducción del gen de interés en un vector de planta que pueda ser introducido en células de plantas, y mantenido transitoriamente en ellas. Los sistemas de vectores virales han demostrado ser particularmente útiles.

Sin embargo, persiste la necesidad de desarrollar sistemas mejorados para la expresión de una molécula de interés en plantas. Por ejemplo, los virus pueden infectar plantas distintas de la diana, planteando potencialmente riesgos ambientales importantes. Asimismo, muchos virus de plantas disponibles manipulados genéticamente no expresan genes insertados a los niveles deseados, y/o en las plantas o tejidos diana deseados. Adicionalmente, una desventaja con diversos sistemas vectores virales existentes es que la estabilidad del virus puede ser problemática. En general, existe necesidad en la técnica de sistemas de expresión en plantas que pudieran permitir mayores flexibilidad y control.

45 Sumario de la Invención

La presente invención abarca el reconocimiento de que la disponibilidad de sistemas de expresión clonales para plantas podría ofrecer numerosas ventajas importantes. La invención proporciona métodos y reactivos para generar una diversidad de entidades clonales derivadas de plantas. Estas entidades clonales incluyen linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales, y plantas clonales. La invención proporciona además métodos y reactivos para expresión de productos polinucleotídicos y polipeptídicos en linajes de células clonales derivados de diversos tejidos de plantas (v.g. raíces, hojas), y en plantas enteras derivadas de células simples (plantas clonales). Los métodos están basados en el uso de vectores virales de plantas de diversos tipos. La invención es como se expone en las reivindicaciones.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un método de obtención de un linaje de raíces clonales que expresa un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) introducir un vector viral que comprende un polinucleótido de interés en una planta o porción de la misma; y (ii) generar una o más linajes de raíz clonales de la planta. Los linajes de raíz clonales pueden generarse, por ejemplo, por infección de la planta o porción de la planta (v.g., una pieza de hoja cosechada) con un *Agrobacterium* (v.g., *A. rhizogenes*) que causa la formación de raíces pilosas. Los linajes de raíz clonales pueden cribarse de diversas maneras para identificar linajes que mantienen el virus, linajes que expresan el polinucleótido de interés a niveles altos, etc. La invención proporciona además linajes de raíz clonales, v.g. linajes de raíz clonales producidos conforme a los métodos de inventiva y abarca adicionalmente métodos de expresión de polinucleótidos y producción de polipeptidos de interés que utilizan los linajes de raíces clonales.

La invención proporciona además un método de regeneración de un linaje de células de raíces clonales que expresan un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) generar un linaje de raíces clonales, cuyas células contienen un vector viral cuyo genoma comprende un polinucleótido de interés; (ii) liberar células individuales del linaje de raíces clonales; y (iii) mantener las células en condiciones adecuadas para proliferación de las células de raíz. La invención proporciona linajes de células de raíces clonales y métodos de expresión de polinucleótidos y producción de polipéptidos que utilizan los linajes de células de raíces clonales.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de generación de un linaje de células de plantas clonales que expresan un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) generar un linaje de raíces clonales, cuyas células contienen un vector viral cuyo genoma comprende un polinucleótido de interés; (ii) liberar células individuales del linaje de raíces clonales; y (iii) mantener las células en cultivo en condiciones apropiadas para proliferación de las células de la planta. La invención proporciona además un método de generación de un linaje de células de plantas clonales que expresan un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) introducción de un vector viral que comprende un polinucleótido de interés en células de un linaje de células de plantas mantenidas en cultivo; y (ii) enriquecimiento de las células que contienen el vector viral. El enriquecimiento puede realizarse, por ejemplo por (i) eliminación de una porción de las células del cultivo; (ii) dilución de las células eliminadas a fin de reducir la concentración de las células; (iii) permisión de proliferación de las células diluidas; y (iv) cribado para células que contengan el vector viral. Los linajes de células de plantas clonales pueden utilizarse para producción del polipéptido de interés.

La invención caracteriza varios métodos para generación de plantas clonales, cuyas células contienen un vector viral que comprende un polinucleótido de interés. Por ejemplo, la invención proporciona un método de regeneración de una plantas clonales que expresa un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) generar un linaje de raíces clonales, cuyas células contienen un vector viral cuyo genoma comprende un polipéptido de interés; (ii) liberar células individuales a partir del linaje de raíces clonales; y (iii) plantar las células en condiciones apropiadas para formación de una planta. La invención proporciona adicionalmente un método de generación de una plantas clonales que expresa un polinucleótido de interés que comprende pasos de: (i) generar un linaje de células de plantas clonales, cuyas células contienen un vector viral cuyo genoma comprende un polinucleótido de interés; y (ii) mantener las células en cultivos apropiados para formación de una planta. En general, las plantas clonales pueden expresar cualquier polinucleótido de interés. Las plantas clonales pueden utilizarse para producción de un polipéptido de interés.

Esta solicitud se refiere a diversas patentes, solicitudes de patente, y publicaciones, que incluyen Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, y Current Protocols in Cell Biology, todas ellas de John Wiley & Sons, N.Y., edición de 2002; Sambrook, Russell, y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Slater, A., Scott, N.W., y Fowler, M.R., Plant Biotechnology, Oxford University Press, 2003. En el evento de un conflicto entre la presente memoria descriptiva y la referencia prevalecerá la memoria descriptiva.

Breve Descripción de los Dibujos

La *Figura 1* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polipéptido de interés. La porción superior de la figura muestra un diagrama de la organización genómica de un constructo de virus basado en TMV, D4, y la porción inferior muestra el mismo constructo después de la inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen que codifica hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. La proteína de 30 kD es la proteína de movimiento (MP) que media el movimiento célula-a-célula. Las flechas indican las posiciones de los promotores subgenómicos. La transcripción del polinucleótido insertado está controlada por el promotor subgenómico de CP de TMV. La porción 3' del constructo incluye secuencias de proteínas de la cubierta de TMV y regiones no traducidas. Estas porciones son opcionales.

La *Figura 2* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polinucleótido de interés. La porción superior de la figura muestra un diagrama esquemático de la organización genómica de un constructo de virus basado en TMV, 30B. La porción inferior muestra el mismo constructo después de la inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen codificante de hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. La proteína de 30 kD es la proteína de movimiento (MP) que media el movimiento célula-a-célula. CP es la proteína de la cubierta que media la propagación sistémica. Las flechas indican las posiciones de los promotores subgenómicos. La transcripción del polinucleótido insertado está controlada por un promotor introducido. La expresión de CP está controlada por el promotor CP endógeno. La porción 3' del constructo incluye secuencias de proteínas de la cubierta de TMV y regiones no traducidas. Estas porciones son opcionales.

La *Figura 3* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polinucleótido de interés y un gen que codifica un marcador para detección y/o

selección. La porción superior de la figura muestra la organización genómica de un constructo de virus basado en TMV, D4. La porción central de la figura muestra el mismo constructo después de la inserción de un gen que codifica un marcador detectable (GFP) que reemplaza la secuencia codificante MP. La porción inferior de la figura muestra el mismo constructo después de la inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen que codifica hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. Las flechas indican posiciones de los promotores subgenómicos. La transcripción del marcador detectable está controlada por un promotor subgenómico de MP. La transcripción del polinucleótido de interés insertado está controlada por el promotor subgenómico de CP de TMV. La porción 3' del constructo incluye secuencias de la proteína de la cubierta de TMV y regiones no traducidas. Estas porciones son opcionales.

La *Figura 4* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polinucleótido de interés y un gen que codifica un marcador para detección y/o selección. La porción superior de la figura muestra la organización genómica de un constructo de virus basado en TMV, D4. La porción central de la figura muestra el mismo constructo después de inserción de un gen que codifica un marcador seleccionable (gen que codifica la resistencia a kanamicina) que reemplaza la secuencia codificante MP. La porción inferior de la figura muestra el mismo constructo después de la inserción de un polinucleótido de interés (v.g. un gen que codifica hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. Las flechas indican posiciones de los promotores subgenómicos. La transcripción del marcador seleccionable está controlada por el promotor subgenómico de MP de TMV. La transcripción del polinucleótido de interés insertado está controlada por el promotor subgenómico de CP de TMV. La porción 3' del constructo incluye secuencias de proteínas de la cubierta de TMV y regiones no traducidas. Estas porciones son opcionales.

La *Figura 5* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de constructos virales basados en AIMV que contienen un polinucleótido de interés como marco de lectura abierto independiente o como fusión genética con secuencias codificantes de CP de AIMV. La porción superior de la figura muestra la organización genómica de RNA3 de AIMV, que incluye genes que codifican CP y MP y que contienen además UTRs 5' y 3' y un promotor subgenómico. El lado izquierdo de la figura muestra un constructo en el cual la transcripción de un mRNA que contiene marcos de lectura abiertos separados que codifican un polinucleótido de interés (indicado como "diana") y la CP de AIMV está controlada por el promotor subgenómico de AIMV. El lado derecho de la figura muestra un constructo en el cual la transcripción de un mRNA que contiene un marco de lectura abierto simple que contiene un polinucleótido de interés y secuencias codificantes de CP están controladas por el promotor subgenómico de CP de AIMV. El marco de lectura abierto codifica una proteína de fusión en la cual un polipéptido de interés está fusionado a CP.

Las *Figuras 6A-6E* ilustran pasos en un método para generación linajes de raíz clonales para expresión de un polinucleótido de interés (indicado como "diana" en la figura). La *Figura 6E* muestra linajes de raíz clonales. La *Figura 6F* muestra linajes de raíz clonales a un nivel de aumento mayor. La *Figura 6G* muestra la expresión de GFP en un linaje de raíz clonal cuyas células contienen un vector viral que codifica GFP.

Las *Figuras 7A-7E* muestran análisis por transferencia Western que demuestran la producción que GFP en 3 linajes de raíz clonales derivados de células de plantas en las que se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GFP bajo control del promotor CP de TMV. La *Figura 7A* muestra la expresión de GFP en los linajes de raíz clonales después de 30 días de propagación en cultivo (es decir, 30 días después de la separación de la raíz de la hoja de la que se derivaba). La *Figura 7B* muestra la expresión de GFP en el linaje de la raíz clonales después de 60 días de propagación en cultivo (es decir 60 días después de separación de la raíz de la hoja de la que se derivaba). C- representa pistas de control que no contienen proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. GFP-R representa muestras de linajes de raíz clonales. GFP-P representan GFP aislada de tejido de hoja de una planta infectada con el mismo constructo utilizado para generación de los linajes de raíces clonales. La *Figura 7C* es un control que muestra que los anticuerpos anti-GFP reconocen la proteína GFP disponible comercialmente.

Las *Figuras 8A y 8B* muestran fotografías de linajes de raíz clonales que producen hGH y GFP. La *Figura 8A* muestra una fotografía de dos linajes de raíz clonales tomada en condiciones de luz normal. La placa de la izquierda muestra un linaje de raíces clonales derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH) bajo control del promotor CP de TMV. La placa de la derecha muestra un linaje de raíces clonales derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) bajo control del promotor CP de TMV. La *Figura 8B* muestra una fotografía de los mismos linajes de raíz clonales que se muestran en la *Figura 8A* tomada bajo luz UV, demostrando la expresión de GFP.

La *Figura 9* muestra un análisis por transferencia Western para cribado de linajes de raíz clonales derivados de células de plantas individuales que se infectaron con un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH) bajo control del promotor CP de TMV. Los linajes de raíz

se criaron 30 días después de la separación de la raíz de la hoja de la que se derivaba. Los linajes de raíz que demostraban niveles altos de expresión se indican con flechas. C- representa pistas de control que no contienen proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. hGH representa la hormona del crecimiento humana recombinante.

5 La *Figura 10* muestra un análisis por transferencia Western que demuestra la producción de hGH en linajes de raíz clonales seleccionados derivados de células de plantas en las cuales se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica hGH bajo control del promotor CP de TMV. El análisis se realizó a continuación de 10 subcultivos después de la separación de las raíces de las hojas de las que se derivaban. C- representa una pista de control que no contienen proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. hGH representa la hormona del crecimiento humana recombinante.

15 Las *Figuras 11A y 11B* muestran análisis por transferencia Western para cribado de linajes de raíz clonales derivados cada uno de células individuales de plantas que se infectaron con un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la hormona del crecimiento humana (GCSF) bajo control del promotor CP de TMV. Los linajes de raíz se criaron 30 días después de la separación de la raíz de la hoja de la que se derivaba. Los linajes de raíz que demostraban niveles altos de expresión se indican con flechas. C- representa pistas de control que no contienen proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. GCSF representa el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinante.

20 La *Figura 12* muestra un análisis por transferencia Western que demuestra la producción de GCSF en linajes de raíz clonales seleccionados derivados de células de plantas en las cuales se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GCSF bajo control del promotor CP de TMV. El análisis se realizó a continuación de 10 subcultivos después de la separación de las raíces de las hojas de las que se derivaban. C- representa una pista de control que no contiene proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. GCSF representa el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinante.

30 La *Figura 13* ilustra pasos en un método para generación de linajes de células de plantas clonales para expresión de un polinucleótido de interés y que identifican linajes de células que exhiben expresión. La *Figura 13A* muestra un vector viral en el cual se ha insertado un polinucleótido de interés bajo control del promotor CP de TMV. La *Figura 13B* muestra una suspensión de protoplastos en la cual se introdujo el vector (placa izquierda) o una suspensión de protoplastos de control en la cual se introdujo un vector que carecía de un polinucleótido codificante de GFP (placa derecha). La fotografía se tomó bajo luz UV y muestra la expresión de GFP en los protoplastos que contienen el vector de expresión codificante de GFP. La *Figura 13C* muestra una suspensión de protoplastos en los cuales se introdujo el vector codificante de GFP. La foto se tomó bajo luz UV. El recuadro (*Figura 13D*) muestra un aumento mayor de células que expresan GFP, tomado también bajo luz UV. La *Figura 13E* es una fotografía que muestra enriquecimiento para linajes de células de plantas que expresan GFP. La foto se tomó bajo luz normal, de linajes de células de plantas individuales derivadas de la suspensión de protoplastos que se muestra en la *Figura 13C*. La *Figura 13F* es una fotografía de las mismas placas representadas en la *Figura 13C*, tomada bajo luz UV. Los cultivos enriquecidos en linajes de células que expresan GFP son evidentes como manchas verdes fluorescentes.

45 La *Figura 14* muestra análisis por transferencia Western que demuestran la producción de GCSF en un linaje de células de plantas clonales derivado de una célula de planta en la que se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GCSF bajo control del promotor CP de TMV. La *Figura 14A* muestra una transferencia Western realizada 48 horas después de la introducción del vector. La *Figura 14B* muestra una transferencia Western realizada utilizando los mismos linajes de células que se muestran en la *Figura 14A* realizada 57 días después de la inoculación. GCSF-COM indica una pista en la cual se cargó como control positivo la proteína recombinante GCSF. MWM indica marcadores de peso molecular. C- indica una pista en la cual se cargó un extracto de plantas obtenido a partir de plantas que no expresaban GCSF.

55 La *Figura 15* muestra la producción de GCSF en un linaje de células de plantas derivado de células de plantas en las cuales se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GFP bajo control del promotor CP de TMV. La *Figura 15A* muestra el enriquecimiento de linajes de células de plantas que expresan GFP. La *Figura 15B* muestra un callo derivado de un linaje de células clonales de plantas en el cual se introdujo un vector viral similar, que no codificaba GFP. Las fotografías se tomaron 3 meses después de la introducción del vector en las células de las que se derivaban los clones de la *Figura 15A*. Ambas fotografías se tomaron bajo luz UV.

60 La *Figura 16A* muestra una plantas clonales que se obtuvo a partir de un linaje de raíces clonales derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral que codificaba hGH. La *Figura 16B* muestra la formación de una lesión en una planta hospedadora sensible que se inoculó con una pequeña muestra de hoja de la planta clonales, indicando que la planta clonal regenerada a partir del linaje de raíces clonales mantiene replicación viral activa. Para ensayar si la planta mantiene replicación del virus, se utilizó una pequeña muestra de hoja para inocular una variedad de tabaco que es un hospedador para la formación de lesiones locales. La formación de lesiones en el transcurso de 2 días de la inoculación (véanse las flechas)

indica que el linaje de la plantas clonales regenerado a partir de un linaje de raíces clonales mantiene replicación activa del virus.

La *Figura 17* muestra una representación esquemática de ciertas familias de virus que infectan plantas.

La *Figura 18* muestra ejemplos representativos de genomas de tobamovirus.

Definiciones

Aproximadamente: "Aproximadamente", con referencia a un número, incluye números que caen dentro de un intervalo de 5% en cualquier dirección (mayor que o menor que) del número a no ser que se indique o sea evidente otra cosa por el contexto (excepto donde dicho número pudiera exceder de 100% de un valor posible). Donde se indican intervalos, los puntos finales están incluidos dentro del intervalo a no ser que se indique otra cosa o sea evidente por el contexto.

Clonal: Para el propósito de la presente invención, el término clonal como se aplica, v.g., a una planta o tejido de planta tal como una raíz, hoja, tallo, etc., significa que la planta o el tejido de planta se derivaban de una sola célula ancestral. En general, las células o una planta o tejido de plantas clonales serán genéticamente idénticas con la excepción de mutaciones somáticas u otras alteraciones genéticas que puedan presentarse en las células descendientes (v.g., por introducción natural o artificial de un gen nuevo en una célula descendiente, acortamiento de telómeros, etc.). Típicamente, el genoma de las células será idéntico al menos en un 95%, idéntico al menos en un 98%, idéntico al menos en un 99%, idéntico al menos en un 99,5%, o idéntico al menos en un 99,9%.

Gen: Para los propósitos de la presente invención, el término gen tiene un significado tal como se entiende en la técnica. En general, se considera que un gen incluye secuencias génicas reguladoras (v.g., promotores, intensificadores, etc.) y/o secuencias de intrón, además de secuencias codificantes (marcos de lectura abiertos). Se apreciará adicionalmente que la definición de gen puede incluir ácidos nucleicos que no codifican proteínas sino que proporcionan más bien moldes para transcripción de moléculas de RNA funcional tales como tRNAs, rRNAs, microRNAs (miRNAs), RNAs de horquilla corta (shRNAs), RNAs interferentes cortos (siRNAs), etc. Con fines de claridad se indicará que, como se utiliza en la presente invención, el término "gen" se refiere generalmente a un ácido nucleico que incluye una porción que codifica una proteína; el término puede abarcar opcionalmente secuencias reguladoras tales como promotores, intensificadores, terminadores, etc. No debe entenderse que esta definición excluya la aplicación del término "gen" a unidades de expresión no codificantes de proteínas, sino que más bien tiene por objeto dejar claro que, en la mayoría de los casos, el término tal como se utiliza en este documento se refiere a un ácido nucleico codificante de proteínas.

Producto génico o producto de expresión: Un producto génico o producto de expresión es, en general, un RNA transcrito por un gen o polinucleótido, o un polipéptido codificado por un RNA transcrito por el gen o polinucleótido. La expresión de un gen o un polinucleótido se refiere a (i) transcripción de RNA a partir del gen o polinucleótido; (ii) traducción de RNA transcrito a partir del gen o polinucleótido, o a la vez (i) y (ii). Otros pasos tales como procesamiento, translocación, etc., pueden tener lugar también en el curso de la expresión o después de ella.

Aislado: Como se utiliza en esta memoria, el término "aislado" se refiere a un compuesto o entidad que 1) está separado(a) de al menos algunos de los componentes con los cuales está asociado normalmente (v.g., purificado); 2) se sintetiza *in vitro*; y/o 3) se produce o se prepara por un proceso que implica la mano del hombre.

Naturalmente: El término "naturalmente" o "que existe naturalmente", como se utiliza en esta memoria, se refiere a procesos, eventos, o cosas que suceden en su forma relevante en la naturaleza. En contraste, "no existente naturalmente", "artificial", o "sintético" se refiere a procesos, eventos, o cosas cuya existencia o forma implica la mano del hombre.

Enlazado operativamente: Como se utiliza en esta memoria, enlazado operativamente se refiere a una relación entre dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos en los cuales la expresión de uno de los ácidos nucleicos o polipéptidos está controlada por, regulada por, modulada por, etc., el otro ácido nucleico o polipéptido. Por ejemplo, la transcripción de una secuencia de ácido nucleico está dirigida por una secuencia promotora enlazada operativamente; el procesamiento posterior a la transcripción de un ácido nucleico está dirigido por una secuencia de procesamiento enlazada operativamente; la traducción de una secuencia de ácido nucleico está dirigida por una secuencia reguladora de la traducción enlazada operativamente; el transporte o localización de un ácido nucleico o polipéptido está dirigido por una secuencia de transporte o localización enlazada operativamente; y el procesamiento posterior a la traducción de un polipéptido está dirigido por una secuencia de procesamiento enlazada operativamente. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico o polipéptido que está enlazada operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico o polipéptido está enlazada covalentemente, sea de modo directo o indirecto, a dicha secuencia, aunque es aceptable cualquier asociación tridimensional eficaz. Se indicará que una sola secuencia de ácido nucleico o polipéptido puede enlazarse operativamente a un número múltiple de otras secuencias. Por ejemplo, un solo promotor puede dirigir la transcripción de especies múltiples de RNA.

Porcentaje (%) de identidad: Con referencia a polinucleótidos, "porcentaje (%) de identidad" se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia polinucleotídica que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia específica de ácido nucleico con la cual se está haciendo la comparación, después de alineación de las secuencias e introducción de lagunas, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Con referencia a polipéptidos, "porcentaje (%) de identidad" se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido con la cual se está haciendo la comparación, después de alinear las secuencias e introducir lagunas, en caso necesario, para conseguir la identidad porcentual máxima de secuencia.

La alineación puede realizarse de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando software de computadora disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medida de la alineación, con inclusión de cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan. La Publicación US No. 20030211568 describe varios métodos adecuados.

Polinucleótido de interés. Como se utiliza en esta memoria, el término "polinucleótido de interés" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico diana a expresar en células de plantas, como se describe en esta memoria. En muchas realizaciones, el polinucleótido de interés será un polinucleótido codificante de proteína (en cuyo caso puede hacerse referencia al polipéptido codificado como un polipéptido o proteína de interés) pero puede ser también una secuencia que proporcione un molde para transcripción de un RNA estructural o un RNA activo tal como una ribozima, cadena de RNA de interferencia, etc. A menudo, el polinucleótido será un gen que no se expresa en la naturaleza en el tipo relevante de célula de planta, o no se expresa al nivel en que se expresa el polinucleótido cuando la expresión se consigue por intervención de la mano del hombre, como se describe en esta memoria. En ciertas realizaciones de la invención, el polinucleótido comprende secuencias génicas que no se encuentran naturalmente en absoluto en la célula de planta relevante; incluyendo a menudo secuencias génicas que se encuentran naturalmente en otros tipos de células u organismos. Alternativa o adicionalmente, un polinucleótido de interés es uno que no está asociado naturalmente con las secuencias vectoras con las que está asociado de acuerdo con la presente invención. El término polinucleótido se utiliza intercambiamente en esta memoria con "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico".

Purificado: Como se utiliza en esta memoria, "purificado" significa separado de uno o más compuestos o entidades, v.g., uno más compuestos o entidades con los cuales se encuentra el mismo naturalmente. Un compuesto o entidad puede ser *parcialmente purificado*, *sustancialmente purificado*, o *puro*, siendo "puro" cuando el mismo está separado esencialmente de todos los restantes compuestos o entidades, es decir, es con preferencia al menos aproximadamente 90%, con más preferencia al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de 99% puro. En el contexto de una preparación de una molécula de ácido nucleico, una preparación puede considerarse sustancialmente pura si el ácido nucleico representa al menos 50% de todas las moléculas de ácido nucleico en la preparación, preferiblemente al menos 75%, todavía más preferiblemente al menos 90%, o más, como se ha indicado arriba, sobre una base de molécula por molécula, una base p/p, o ambas. En el contexto de la preparación de un polipéptido, una preparación puede considerarse sustancialmente pura si el polipéptido representa al menos 50% de todos los polipéptidos en la preparación, preferiblemente al menos 75%, todavía más preferiblemente al menos 90%, o más, como se ha indicado arriba, sobre una base de molécula por molécula, una base p/p, o ambas. Un ácido nucleico o polipéptido parcial o sustancialmente purificado puede estar separado de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, etc., del material con el que se encuentra naturalmente, v.g., material celular tal como otras proteínas y/o ácidos nucleicos celulares.

Recombinante: Una molécula "recombinante" se refiere a una molécula que ha sido alterada por la mano del hombre o que se deriva de (v.g., está copiada de) de una molécula de este tipo. Un polinucleótido recombinante contiene típicamente secuencias que no se encuentran unidas unas a otras en la naturaleza y/o que difieren de una secuencia existente naturalmente. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede estar incluido en un vector adecuado, y el vector puede utilizarse para transformar una célula adecuada, a la que puede hacerse referencia como una "célula recombinante". El nucleótido puede expresarse luego en la célula recombinante para producir, v.g., un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante puede servir también para una función no codificante (v.g., como promotor, origen de replicación, sitio de fijación de ribosoma, etc.). Un ácido nucleico recombinante, v.g., un ácido nucleico viral recombinante puede ser un ácido nucleico viral en el cual una o más secuencias presentes en la forma existente naturalmente se ha(n) delecionado o reemplazado por una secuencia diferente o en el cual se ha insertado una secuencia no nativa. Un "polipéptido recombinante" contiene típicamente secuencias que no se encuentran unidas unas a otras en la naturaleza y/o que difieren de una secuencia existente naturalmente. Un ejemplo de un polipéptido recombinante es una proteína de fusión, v.g., una proteína que contiene dos o más proteínas o péptidos diferentes (que pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser porciones de un polipéptido existente naturalmente o sintético). Un polinucleótido recombinante que codifica una proteína de fusión puede crearse por eliminación del codón de parada del polinucleótido que codifica la primera proteína o péptido y adición como apéndice de un polinucleótido que codifica la segunda proteína o polipéptido en marco, de tal modo que el polinucleótido recombinante resultante codifica un solo polipéptido recombinante que comprende las dos proteínas o péptidos.

El término "elemento regulador" o "secuencia reguladora" con referencia a un ácido nucleico se utiliza generalmente en esta memoria para describir una porción de ácido nucleico que dirige o aumenta uno o más pasos en la expresión (particularmente transcripción, pero en algunos casos otros eventos tales como remodelación u otro procesamiento) de secuencia(s) de ácido nucleico con la o las cuales está enlazado operativamente. El término incluye promotores y puede referirse también a intensificadores y otros elementos de control de la transcripción. Los promotores son regiones de ácido nucleico que incluyen un sitio al que se fija una RNA-polimerasa antes de iniciar la transcripción y que son típicamente necesarios para que ocurran incluso niveles de transcripción basales. Generalmente, tales elementos comprenden una secuencia TATA. Los intensificadores son regiones de ácido nucleico que abarcan sitios de fijación para proteína(s) que aumentan la actividad de transcripción de un promotor localizado próximo o distante, típicamente por encima de cierto nivel basal de expresión que podría existir en ausencia del intensificador. En algunas realizaciones de la invención, las secuencias reguladoras pueden dirigir la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica (v.g., la expresión en la mayoría o la totalidad de los tipos de células en condiciones fisiológicas típicas en cultivo o en un organismo); en otras realizaciones, las secuencias reguladoras pueden dirigir la expresión directa específica de la célula o tejido y/o la expresión inducible. Por ejemplo, la expresión puede inducirse por la presencia o adición de un agente inductor tal como una hormona u otra molécula pequeña, por un aumento de temperatura, etc. Los elementos reguladores pueden inhibir o reducir también la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente.

En general, el nivel de expresión puede determinarse utilizando técnicas estándar para medida de mRNA o proteína. Tales métodos incluyen transferencia Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, secuenciación, métodos inmunológicos tales como inmunotransferencia, inmunodetección, o detección por fluorescencia después de tinción con anticuerpos marcados fluorescentemente, microrredes de oligonucleótidos o cDNA o redes de membranas, análisis de redes de proteínas, espectrometría de masas, etc. Una manera conveniente para determinar el nivel de expresión consiste en situar un ácido nucleico que codifica un marcador fácilmente detectable (v.g., una proteína fluorescente o luminiscente tal como la proteína fluorescente verde o luciferasa, una enzima tal como fosfatasa alcalina, etc.) en asociación operativa con el elemento regulador en un vector de expresión, introducir el vector en un tipo de célula de interés o en un organismo, mantener la célula u organismo durante cierto periodo de tiempo, y medir finalmente la expresión del marcador fácilmente detectable, aprovechando la ventaja de cualquier propiedad que lo haga fácilmente detectable (v.g. fluorescencia, luminiscencia, alteración de las propiedades ópticas de un sustrato, etc.). La comparación de la expresión en ausencia y presencia del elemento regulador indica el grado en el que el elemento regulador afecta a la expresión de una secuencia enlazada operativamente.

Auto-réplica: Como se utiliza en esta memoria, "auto-réplica" se refiere a la capacidad de un vector para copiarse por sí mismo en el interior de una célula hospedadora. Un vector que puede "autorreplicarse" lleva información suficiente en sus propios elementos genéticos que no está basada en otros elementos genéticos (v.g. los utilizados por la célula hospedadora para replicar su propio genoma) para su replicación. En general, un vector que puede autorreplicarse es uno que incluye al menos un gen de replicasa tal como una RNA-polimerasa y posiblemente genes de replicasa adicionales tales como una helicasa, metiltransferasa, etc. En ciertos casos, se requieren secuencias adicionales, presentes en *cis* (es decir, como parte de la secuencia vectora) o pueden facilitar la autorreplicación. Se comprenderá que un vector autorreplicante utilizará típicamente componentes de la célula hospedadora tales como nucleótidos, aminoácidos, etc., y puede ser dependiente en ciertas funciones y/o enzimas de la célula hospedadora que suministra tales componentes.

Vector: "Vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido, y puede incluir un vector de plásmido, cósmido o viral. El vector puede ser capaz de replicación autóloga. Alternativa o adicionalmente, un vector puede proporcionar uno o más componentes necesarios o suficientes para autorreplicación, o para replicación o integración de otra pieza de ácido nucleico. Los vectores son típicamente ácidos nucleicos, y pueden comprender DNA y/o RNA. Los vectores preferidos se mantienen extracromosómicamente.

Ácido nucleico viral: El término "ácido nucleico viral" se refiere al genoma de un virus, o una porción del mismo (o, en el caso de virus cuyo genoma comprende segmentos múltiples, cualquiera de los segmentos o una porción de un segmento de este tipo). El término abarca formas tanto de RNA como de DNA de tales ácidos nucleicos y moléculas que tienen secuencias complementarias. Las moléculas de DNA idénticas a o complementarias de ácidos nucleicos de RNA virales se consideran ácidos nucleicos virales, y las moléculas de RNA idénticas a o complementarias de ácidos nucleicos de DNA virales se consideran ácidos nucleicos virales, entendiéndose que DNA y RNA contendrán T y U, respectivamente, en las posiciones correspondientes.

Un ácido nucleico viral puede incluir una o más porciones de origen no viral (v.g., parte o la totalidad de un gen existente naturalmente, una secuencia totalmente artificial, o una combinación de secuencias existentes naturalmente y artificiales) y puede incluir una o más porciones de tipos de virus diferentes múltiples.

Replicón viral: El término "replicón viral" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una porción o porciones (secuencias *cis*) suficiente(s) para replicación del ácido nucleico por genes de replicasa virales. Típicamente, tales secuencias incluyen un sitio de reconocimiento para una polimerasa viral, v.g. una RNA-polimerasa viral del caso de replicones virales basados en virus de RNA.

Descripción Detallada de Ciertas Realizaciones de la Invención

I. Sistemas de Expresión Clonales de Plantas y Tejidos de Plantas

Como se ha indicado arriba, la presente invención proporciona sistemas para expresión de un polinucleótido o polinucleótidos de interés en linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales (v.g. linajes de células derivados de hoja, tallo, etc.), y en plantas clonales. El polinucleótido de interés se introduce en una célula de planta ancestral que utiliza un vector viral de planta cuyo genoma incluye el polinucleótido de interés enlazado operativamente a (es decir, bajo control de) un promotor. Un linaje de raíces clonales o linaje de células de plantas clonales se establece a partir de la célula que contiene el virus de acuerdo con cualquiera de varias técnicas descritas adicionalmente más adelante. El vector de virus de planta o porciones del mismo puede introducirse en la célula de planta por infección, por inoculación con un transcrito viral o clon de cDNA infeccioso, por electroporación, por transferencia de genes mediada por T-DNA, etc.

Las secciones que siguen describen virus de plantas, vectores virales de plantas, y métodos para creación de vectores virales de plantas para uso en la presente invención. Los métodos de inventiva para generación de linajes de raíz clonales, linaje de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales, y plantas clonales que expresan un polinucleótido de interés se describen a continuación. Un "linaje de raíz" se distingue de un "linaje de células de raíz" en que un linaje de raíz produce estructuras reales semejantes a raíz o raíces mientras que un linaje de células de raíz está constituido por células de raíz que no forman estructuras semejantes a raíz. Debe entenderse que el uso del término "linaje" indica que las células del linaje pueden proliferar y transmitir información genética a células de la progenie. Las células de un linaje de células proliferan típicamente en cultivo sin ser parte de una estructura organizada tales como las que se encuentran en una planta intacta. El uso del término "linaje de raíz" debe entenderse que indica que las células en la estructura de raíz pueden proliferar sin formar parte de una planta completa. Debe indicarse que el término "célula de planta" abarca células de raíz. Sin embargo, para distinguir los métodos de inventiva para generación de linajes de raíz y linajes de células de raíz de los utilizados para generar directamente linajes de células de plantas a partir de tejido distinto de raíz (en oposición a la generación de linajes de células de plantas clonales a partir de linajes de raíz clonales o plantas clonales derivadas de linaje de raíces clonales), los términos "célula de planta" y "linaje de células de planta" como se utilizan en esta memoria se refieren generalmente a células y linajes de células que están constituidos por tejido de planta distinto de raíz. Las células de plantas pueden ser, por ejemplo, hoja, tallo, brote, parte de flor, etc. Se indicará que pueden derivarse semillas de las plantas clonales generadas como se deduce de esta memoria. Tales semillas contendrán también el vector viral al igual que las plantas obtenidas a partir de tales semillas. Los métodos para obtención de stocks de semillas son bien conocidos en la técnica. Véase, v.g., U.S.S.N.10/294314.

A. Virus de Plantas y Vectores Virales de Plantas

Se conocen una gran diversidad de virus que infectan diversas especies de planta, y pueden emplearse para expresión de polinucleótidos conforme a la presente invención. La Figura 17 muestra 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 (v.g., dsDNA, ssDNA, ssRNA, dsRNA, o no asignado) que constituye el genoma viral. Puede encontrarse información adicional, por ejemplo, en *The Classification and Nomenclature of Viruses*, "Sexto Informe del Comité Internacional sobre Taxonomía de los Virus" (editorial Murphy et al.), Springer Verlag: Nueva York, 1995, cuyos contenidos completos se incorporan en esta memoria por referencia (véase también, Grierson et al., *Plant Molecular Biology*, Blackie, Londres, pp. 126-146, 1984; Gluzman et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, pp. 172-189, 1988; Mathew, *Plant Viruses Online* (<http://image.fs.uidaho.edu/vide/>)).

En la naturaleza, con objeto de penetrar en una célula de planta e infectarla, los virus de plantas precisan atravesar la pared celular, además de capas protectoras de ceras y pectinas. Se cree que la mayoría o la totalidad de los virus de plantas están basados en la rotura mecánica de la pared celular, más bien que en receptores de la superficie de la pared celular, para penetrar en una célula. Una rotura de este tipo puede estar causada, por ejemplo, por deterioro físico de la célula, por un organismo tal como una bacteria, un hongo, un nematodo, un insecto, o un ácaro que puede suministrar el virus. En el laboratorio, los virus se administran típicamente a las células de plantas simplemente por frotamiento del virus sobre la planta.

Algunos virus de plantas tienen genomas segmentados, en los cuales dos o más piezas de ácido nucleico físicamente separadas constituyen juntas el genoma de la planta. Por ejemplo, muchos genomas de virus de RNA de plantas pueden clasificarse como mono-, bi-, o tri-partitos, es decir, pueden estar constituidos por 1, 2, ó 3 ácidos nucleicos respectivamente. En algunos casos, estas piezas separadas están empaquetadas juntas en la misma cápsida viral; en otros (es decir, aquéllos con genomas multipartitos), cada segmento de genoma está empaquetado en su propia partícula viral. La infección puede realizarse típicamente por suministro del ácido nucleico viral de la planta (v.g., RNA) o la cápsida que contiene dicho ácido nucleico.

Una vez que el virus ha penetrado en (infectado) una célula, el mismo se replica típicamente en el interior de la célula infectada y se propaga luego localmente (es decir, de célula a célula dentro de las hojas que se infectaron inicialmente). Después de la propagación local, el virus puede desplazarse a hojas no infectadas, v.g., hojas superiores de la planta, a lo que se hace referencia como infección sistémica o propagación sistémica. En general, la propagación célula-a-célula de muchos virus de plantas requiere una proteína funcional de movimiento (que permite el movimiento de transcritos virales) mientras que la propagación sistémica requiere una proteína funcional de la cubierta (y, generalmente, también una proteína funcional de movimiento), lo que permite la formación de partículas virales.

Además de componentes codificantes de proteínas funcionales de movimiento y de la cubierta, el genoma viral puede contener componentes adicionales que son necesarios para propagación local (v.g., célula-a-célula) o a larga distancia (v.g., sistémica) o facilitar dicha propagación. Estos componentes de acción *cis* pueden ser componentes codificantes o no codificantes. Por ejemplo, los mismos pueden corresponder a porciones de una región 3' no traducida (UTR, a la que se hace referencia también como NTR) de un transcrito viral (v.g., pueden proporcionar un molde para transcripción de una región 3' no traducida de un transcrito viral). Así, los componentes virales importantes pueden ser regiones codificantes o no codificantes de un genoma viral e incluir una diversidad de regiones reguladoras. Tales regiones pueden funcionar en la replicación y/o procesamiento o expresión de mRNA. Por "componente funcional codificante de proteínas" se entiende un polinucleótido que comprende una porción codificante que codifica una proteína funcionalmente activa, enlazada operativamente a elementos reguladores suficientes tales como un promotor, a fin de que se consiga la expresión.

Con objeto de establecer con éxito una infección local (intra-hoja) o sistémica, un virus tiene que ser capaz de replicarse. Muchos virus contienen genes que codifican una o más proteínas que participan en el proceso de replicación (a las que se hace referencia en esta memoria como proteínas de replicación o proteínas replicasa). Por ejemplo, muchos virus de RNA de plantas codifican una RNA-polimerasa. Pueden requerirse también proteínas adicionales, v.g. proteína(s) helicasa o metiltransferasa. El genoma o segmento viral puede contener diversos componentes de secuencia, v.g., secuencias de acción *cis*, además de genes funcionales que codifican proteínas de replicación, que se requieren también para la replicación o facilitan la misma. Los genomas o segmentos virales pueden contener también secuencias de acción *cis* que contribuyen a niveles altos de transcrito y/o expresión. Se indicará que los ácidos nucleicos que codifican diversas proteínas virales, v.g., proteínas replicasa, proteína de movimiento, proteína de la cubierta, pueden estar presentes dentro de moléculas de ácido nucleico viral diferentes, que pueden complementarse unas a otras en *trans*. (Véase, v.g., WO 00/25574 y la Solicitud Nacional U.S. No. Ser. 10/770600, también en tramitación, titulada "SYSTEM FOR EXPRESSION OF GENES IN PLANTS", presentada el 3 de febrero de 2004. Así, en ciertas realizaciones de la invención, en lugar de suministrar un solo vector viral a una célula de planta, se suministran vectores múltiples diferentes que, juntos, permiten la replicación (y, opcionalmente, el movimiento célula-a-célula y/o a larga distancia) del o de los vectores virales. Algunas o la totalidad de las proteínas pueden estar codificadas por el genoma de plantas transgénicas.

Vectores virales basados en cualquier virus que infecta plantas pueden utilizarse para generar un linaje de raíces clonales, linaje de células de plantas clonales o planta clonal que expresa un polinucleótido de interés conforme a la presente invención. Virus particularmente preferidos son virus ssRNA, muy deseablemente con un genoma de cadena (+). Métodos y reactivos para manipulación del material genético presente en tales virus son bien conocidos en la técnica. Típicamente, por ejemplo, se prepara una copia de DNA del genoma viral y se clona en un vector microbiano, particularmente un vector bacteriano. Ciertos virus de ssDNA, con inclusión particularmente de geminivirus, pueden utilizarse también. Se apreciará que, en general, los vectores virales de plantas y ácidos nucleicos virales tales como genomas virales pueden existir en forma de RNA o DNA. Adicionalmente, donde se hace referencia a una característica tal como un genoma o porción del mismo de un virus de RNA, que está presente dentro de un vector de DNA, debe entenderse que la característica está presente como la copia de DNA de la forma RNA.

Los vectores preferidos están basados en virus tales como miembros de las *Bromoviridae* (v.g., bromovirus, alfamovirus, ilarvirus) y *Tobamoviridae*. Ciertas especies de virus preferidas incluyen, por ejemplo, el Virus del Mosaico de la Alfalfa (AIMV), el Virus de las Manchas Cloróticas del Manzano, el Virus del Estriado del Tallo del Manzano, el Virus del Mosaico Rayado de la Cebada, el Virus Amarillo Enano de la Cebada, el Virus Amarillo de la Remolacha, el Virus del Moteado del Haba, el Virus del Marchitamiento del Haba, el Virus del Mosaico del Bromo (BMV), el Virus Latente del Clavel, el Virus Moteado del Clavel, el Virus de Manchas Anilladas del Clavel, el Virus del Moteado de la Zanahoria, el Virus Latente de la Mandioca (CLV), el Virus del Moteado Clorótico del Frijol de Vaca, el Virus del Mosaico del Frijol de Vaca (CPMV), el Virus del Mosaico Moteado Verde del Pepino, el Virus del Mosaico del Pepino, el Virus Infeccioso Amarillo de la Lechuga, el Virus del Moteado Clorótico del Maíz, el Virus del Rayado Fino del Maíz, el Virus del Moteado del Maíz (MSV), el Virus del Moteado Amarillo de la Chirivía, el Virus del Mosaico con Excrecencias del Guisante, el Virus X de la Patata, el Virus Y de la Patata, el Virus del Enanismo Arbustivo de la Frambuesa, el Virus de la Necrosis del Arroz (RNV), el Virus del Rayado del Arroz, el Virus Esférico del Tungro del Arroz, el Virus del Mosaico del Ballico, el Virus del Mosaico del Trigo Transportado por el Suelo, el Virus del Mosaico de la Judía del Sur, el Virus del Grabado del Tabaco (TEV), el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), el Virus de la Necrosis del Tabaco, el Virus del Cascabeleo del Tabaco, el Virus de las Manchas Anilladas

del Tabaco, el Virus de la Atrofia Arbustiva del Tomate, el Virus del Mosaico Dorado del Tomate (TGMV), y el Virus del Mosaico Amarillo del Nabo (TYMV).

En ciertas realizaciones de la invención se utiliza un vector viral basado en TMV (ácido nucleico viral). TMV es el miembro típico del grupo de los tobamovirus. Los tobamovirus tienen genomas de RNA de cadena (+) simple, y producen viriones en forma de varilla constituidos por el genoma de RNA y polipéptidos de la proteína de la cubierta (CP). Los genomas de tobamovirus codifican 4-5 polipéptidos. Dos de los polipéptidos se traducen desde el mismo codón de iniciación 5'-proximal y funcionan en la replicación viral. Estos polipéptidos incluyen una RNA-polimerasa dependiente de RNA. Adicionalmente, polipéptidos que tienen actividad de metiltransferasa y RNA-helicasa están codificados típicamente. Las otras proteínas codificadas incluyen típicamente una proteína de movimiento y la proteína de la cubierta, cada una de las cuales se traduce a partir de un RNA subgenómico separado. Ejemplos representativos de genomas de tobamovirus se muestran en la Figura 18. Tobamovirus distintos de TMV pueden utilizarse en diversas realizaciones de la invención.

El genoma de TMV tiene una longitud de 6395 nucleótidos y está encapsidado con una CP de 17,5 kD, que produce varillas de 300 nm de longitud. Además de CP, TMV tiene 3 proteínas no estructurales: las proteínas de 183 y 126 kD se traducen a partir de RNA genómico y son necesarias para la replicación viral. La proteína de movimiento de 30 kD contribuye a la transferencia del RNA viral célula-a-célula. Especies de plantas susceptibles de infección con TMV incluyen *Beta vulgaris*, *Capsicum frutescens*, *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*.

En diversas otras realizaciones de la invención se utiliza un vector viral basado en AIMV (ácido nucleico viral). AIMV es un *Alfamovirus*, estrechamente afín al grupo *Iilarvirus*, y es un miembro de la familia *Bromoviridae*. El genoma de AIMV está constituido por 3 RNAs de sentido positivo (RNAs 1-3). Los RNAs 1 y 2 codifican las proteínas replicasa P1 y P2, respectivamente; RNA3 codifica la proteína de movimiento célula-a-célula, P3. Un RNA subgenómico, RNA4, se sintetiza a partir de RNA3. Este RNA4 subgenómico codifica la proteína de la cubierta viral (CP). CP participa en la activación del genoma viral para iniciar la infección, replicación del RNA, ensamblaje viral, estabilidad del RNA viral, movimiento a larga distancia del RNA viral, y formación de síntomas. AIMV depende de una proteína funcional P3 para el movimiento célula-a-célula, y requiere la infección completa de la proteína CP. Dependiendo del tamaño del RNA viral encapsidado en CP, los viriones de AIMV pueden variar significativamente en tamaño (v.g., 30 a 60 nm de longitud y 18 nm de diámetro) y forma (v.g., esférica, elipsoidal, o baciliforme).

La gama de hospedadores de AIMV es muy amplia e incluye las cosechas agrícolas valiosas alfalfa (*Medicago sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (*Lactuca sativa*), judía común (*Phaseolus vulgaris*), patata (*Solanum tuberosum*), trébol blanco (*Trifolium repens*) and soja (*Glycine max*). Especies hospedadoras particulares susceptibles 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 amaranticolor*, *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*, *Plailadelphus*, *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 tetragonioides*, *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*. Si bien AIMV es un vector viral preferido, pueden utilizarse también otros alfamovirus en diversas realizaciones de la invención. También pueden utilizarse virus afines, tales como ilarvirus.

B. Creación de Vectores de Expresión Viral en Plantas

Elementos de estos virus de plantas se modifican genéticamente de acuerdo con 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 and Loesch-Fries, *Virology*, 208(1): 405-7, 1995. Spitsin et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(5): 2549-53, 1999, etc.) para generar vectores virales para uso de acuerdo con la presente invención. En general, un vector viral es un ácido nucleico viral. Típicamente el vector viral es el genoma, o una mayor parte del mismo (es decir, al menos

50% del genoma), de un virus, o una molécula de ácido nucleico complementaria en secuencia de bases a dicha molécula de ácido nucleico. En el caso de virus segmentados, el vector viral puede ser un segmento de genoma, o una mayor parte del mismo. El vector viral puede encontrarse en forma de RNA o DNA.

5 Preferiblemente, el vector viral comprende una porción suficiente para soportar la replicación del vector viral en presencia de las proteínas replicasa virales apropiadas, es decir, constituye un replicón viral. La aptitud de cualquier porción particular de un genoma viral para soportar la replicación de un ácido nucleico que incluye la porción, en presencia de proteínas virales replicasa, puede ensayarse fácilmente utilizando métodos conocidos en la técnica, v.g., por fabricación de mutantes de delección, por transferencia de la porción a un ácido nucleico que no soporta la replicación y determinación de si ocurre replicación, etc. Las proteínas replicasa pueden estar codificadas por el vector, por otro vector, o por una planta en la cual se introduce el vector. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, el vector es capaz de autorreplicación, es decir, codifica las proteínas virales necesarias para replicación del virus en un hospedador de planta apropiado. En ciertas realizaciones de la invención, el vector comprende un gen MP. En ciertas realizaciones de la invención, el vector comprende un gen CP. No obstante, en ciertas realizaciones de la invención no está presente en el vector un gen MP ni un gen CP. Dado que los linajes de raíz clonales, linajes de plantas clonales, y plantas clonales se derivan de células ancestrales simples en las cuales se ha introducido el vector, no es necesario que el vector viral tenga capacidad de movimiento célula-a-célula o a larga distancia. En particular, las plantas clonales pueden expresar el polinucleótido de interés en toda la planta aun cuando el transcrito viral no se mueve, dado que cada célula se deriva de una célula ancestral simple que contiene el vector viral.

En general, un polinucleótido de interés se inserta en un vector viral bajo control de (es decir, enlazado operativamente a), un promotor que dirige la transcripción del polinucleótido en una célula de planta de interés. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, se utiliza un promotor viral de plantas, v.g., un promotor para la proteína de la cubierta, la proteína de movimiento, etc. El polinucleótido de interés puede insertarse en lugar de la secuencia codificante endógena MP o CP. Por ejemplo, como se describe con mayor detalle en los Ejemplos, puede utilizarse un vector basado en TMV en el cual la secuencia codificante CP de TMV ha sido reemplazada por un polinucleótido de interés, bajo control del promotor CP de TMV. Alternativamente, el polipéptido insertado puede incluir su propio promotor, que puede ser idéntico o similar a uno de los promotores virales existentes naturalmente, puede ser de un virus diferente (v.g., el virus del mosaico de la coliflor), puede ser un promotor no viral tal como un promotor de un gen de planta, o un promotor sintético. En ciertas realizaciones de la invención se utiliza un promotor inducible. Se conocen una diversidad de promotores inducibles que funcionan en plantas. Véase, v.g., Zuo, J. y Chua, N-H., "Chemical-Inducible Systems for Regulated Expression of Plant Genes", Curr. Op. en Biotechnol., 11: 146-51, 2000. Por ejemplo, puede utilizarse promotores inducibles por metales tales como cobre, o sensibles a hormonas tales como estrógeno, o sistemas sensibles a otras moléculas pequeñas tales como tetraciclina. Pueden utilizarse otros estímulos tales como calor, luz, etc. Véase U.S.S.N. 10/294314.

En ciertas realizaciones de la invención en alguno de sus aspectos, se utiliza trans-activación para inducir o aumentar la expresión de un polinucleótido de interés. Por ejemplo, la casete de expresión que comprende el polinucleótido puede ser una casete de expresión inactiva que comprende una secuencia de ácido nucleico extraña inactiva o silenciada, que es capaz de dirigir la expresión de un polinucleótido de interés después de su activación. En ciertas realizaciones de la invención, la transactivación se realiza por introducción de un factor de activación o que facilita la expresión de una secuencia polinucleotídica inactiva o silenciada en las células de la entidad clonales. Un promotor que puede activarse in trans de dicha manera se conoce como "trans-activable". Véase U.S.S.N. 10/832603, titulado "Expression of Foreign Sequences in Plants Using Trans-Activation System", que se incorpora en esta memoria por referencia, para detalles adicionales de ciertos métodos adecuados. Tales métodos incluyen técnicas basadas en recombinación (v.g., utilizando un sistema de recombinasa Lox/Cre o Flp/Frt) y técnicas basadas en proteínas que comprenden un dominio de fijación de DNA tal como GAL4 y un dominio de activación transcripcional tal como VP16. Una diversidad de otros métodos pueden utilizarse para conseguir la trans-activación.

En ciertas realizaciones de la invención, el polinucleótido se inserta para crear un marco de lectura abierto independiente, mientras que en otras realizaciones de la invención el polinucleótido se inserta para crear un marco de lectura abierto en el cual un polinucleótido que carece de un codón de parada está insertado en marco con secuencias codificantes de parte o la totalidad de una proteína viral tal como CP, de tal modo que se produce una proteína de fusión después de la traducción. Pueden insertarse polinucleótidos múltiples. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, el vector TMV retiene parte o la totalidad de su UTR 3' y/o parte o la totalidad de la secuencia codificante CP. En ciertas realizaciones de la invención, el polinucleótido de interés o un vector viral en el cual está insertado el polinucleótido de interés comprende una porción que codifica una secuencia de direccionamiento, v.g., una secuencia que direcciona un polipéptido codificado a un orgánulo o compartimiento intracelular particular. Por ejemplo, puede ser deseable direccionar un polipéptido de interés al retículo endoplásmico, lo que puede dar como resultado finalmente la secreción del polipéptido. El polipéptido secretado puede cosecharse luego del medio de cultivo o del fluido intersticial de un tejido de planta.

65 Las Figuras 1-5 muestran ejemplos de la manipulación genética de diversos vectores de virus de plantas adecuados para uso en la presente invención. La Figura 1 muestra un constructo de virus basado en TMV, D4, y el mismo

constructo después de la inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen que codifica hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana") cuya transcripción está controlada por el promotor subgenómico de CP de TMV. Detalles concernientes a la creación de tales vectores se dan en el Ejemplo 1.

5 La *Figura 2* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polinucleótido de interés. La porción superior de la figura muestra la organización genómica de un constructo de virus basado en TMV, 30B (Yusibov, V., Shivprasad, S., Turpen, T.H., Dawson, W., y Koprowski, H., "Plant viral vectors based on tobamoviruses", en *Plant Biotechnology: New Products and Applications* (Eds. J. Hammond, P. McGarvey, y V. Yusibov), pp.81-94, Springer-Verlag, 1999). La porción inferior muestra el mismo constructo después de inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen que codifica hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. La proteína de 30 kD es la proteína de movimiento (MP) que media el movimiento célula-a-célula. CP es la proteína de la cubierta que media la propagación sistémica. Las flechas indican posiciones de los promotores subgenómicos en ciertas realizaciones de la invención. La transcripción del polinucleótido insertado está controlada por de un promotor introducido. La expresión de CP está controlada por el promotor CP endógeno en el constructo representado en la *Figura 2*.

Pueden utilizarse también vectores similares en los cuales el polinucleótido de interés está en marco con la secuencia codificante CP a fin de codificar una proteína de fusión. En general, los polinucleótidos de interés (y sus proteínas codificadas) pueden expresarse como marcos de lectura abiertos independientes (véase, v.g., Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Dawson, W.O., y Turpen, T.H. "Tobamovirus transient expression vectors: tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants", *Pl. Mol. Biol. Manual*. L4, 1-27., 1998) o como fusiones con la proteína de la cubierta (Yusibov, V., Modelska, A., Stepiewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, C. y Koprowski, H., "Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5784-5788, 1997). En el vector descrito en el último documento, las secuencias diana se replican a partir de un segundo promotor subgenómico. En general, la transcripción de un polinucleótido de interés y/o un gen endógeno tal como MP o CP puede estar dirigida por promotores endógenos o promotores insertados (que pueden ser idénticos a los vectores existentes naturalmente del mismo virus o un virus diferente o pueden ser sintéticos, o una combinación de secuencias naturales y sintéticas).

La porción 3' del constructo incluye preferiblemente la UTR 3' de TMV, que puede formar una o más estructuras tallo-bucle como se muestra. La porción 3' del constructo puede incluir también secuencias de la proteína de la cubierta de TMV que contienen un elemento *cis* que puede ser necesario para replicación óptima. Esta secuencia es opcional.

La *Figura 3* presenta un diagrama esquemático de la manipulación genética de un constructo viral basado en TMV que contiene un polinucleótido de interés y un gen que codifica un marcador, v.g., un marcador que permite detección y/o selección. La porción superior de la figura muestra la organización genómica de un constructo viral basado en TMV, D4. La porción central de la figura muestra el mismo constructo después de inserción de un gen codificante de un marcador detectable (GFP) que reemplaza la secuencia codificante MP. La porción inferior de la figura muestra el mismo constructo después de inserción de un polinucleótido de interés (v.g., un gen codificante de hGH, GCSF, GFP, etc., indicado como "diana"). La proteína de 126/183 kDa es necesaria para la replicación del virus. Las flechas indican posiciones de los promotores subgenómicos. La transcripción del marcador detectable está controlada por el promotor subgenómico de MP. La transcripción del polinucleótido de interés insertado está controlada por el promotor subgenómico de CP de TMV. No obstante, podrían utilizarse otros promotores como se ha descrito arriba. La porción 3' del constructo incluye secuencias de la proteína de la cubierta de TMV que contienen un elemento *cis* que puede ser necesario para replicación óptima y que puede formar una o más estructuras tallo-bucle como se muestra.

La *Figura 4* muestra un vector similar al representado en la *Figura 3*, excepto que está insertado un marcador seleccionable (un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a kanamicina) en lugar de un gen codificante de GFP. La inclusión de un gen que codifica un marcador detectable o seleccionable además de un polinucleótido de interés es útil en la identificación de linajes de raíz clonales y linajes de células de plantas clonales que contienen el vector y/o para identificación de aquellos linajes que exhiben niveles de expresión altos y/o estables.

En general, pueden utilizarse una gran diversidad de marcadores diferentes de acuerdo con la presente invención. En general, un marcador adecuado para uso en la invención es un marcador detectable o un marcador seleccionable. Debe indicarse que, de acuerdo con la práctica en la técnica, el término "marcador" puede referirse a una secuencia nucleotídica, v.g., un gen, que codifica un producto (proteína) que permite la detección o selección, o puede utilizarse para hacer referencia a la proteína propiamente dicha. El término "marcador seleccionable" se utiliza en esta memoria como es entendido generalmente en la técnica y se refiere a un marcador cuya presencia dentro de una célula u organismo confiere una ventaja o desventaja significativa de crecimiento o supervivencia en la célula u organismo en ciertas condiciones de cultivo definidas (condiciones selectivas). Por ejemplo, las condiciones pueden ser la presencia o ausencia de un compuesto particular o una condición ambiental particular tal como temperatura incrementada, radiación incrementada, presencia de un compuesto que es tóxico en ausencia del marcador, etc. La

presencia o ausencia de tal o tales compuestos o condiciones ambientales se conoce como una "condición selectiva" o "condiciones selectivas". Por "ventaja de crecimiento" se entiende o bien viabilidad incrementada (v.g., las células u organismos con la ventaja de crecimiento tienen una duración de vida incrementada, por término medio, con relación a otras células idénticas por lo demás), tasa de proliferación incrementada (a la que se hace referencia también en esta memoria como "tasa de crecimiento") con relación a células u organismos idénticos por lo demás, o ambas cosas. En general, una población de células que tienen ventaja de crecimiento exhibirá un número menor de células muertas o no viables y/o una tasa de proliferación celular mayor que una población de células idénticas por lo demás que carecen de la ventaja de crecimiento. Aunque un marcador seleccionable conferirá típicamente una ventaja de crecimiento a una célula, ciertos marcadores seleccionables confieren una desventaja de crecimiento a una célula, v.g., hacen que la célula sea más sensible a los efectos deletéreos de ciertos compuestos o condiciones ambientales que células idénticas por lo demás que no expresan el marcador.

Los marcadores de resistencia a los antibióticos son un ejemplo no limitante de una clase de marcador seleccionable que puede utilizarse para seleccionar células que expresan el marcador. En presencia de una concentración apropiada de antibiótico (condiciones selectivas), un marcador de este tipo confiere una ventaja de crecimiento a una célula que expresa el marcador. Así, las células que expresan el marcador de resistencia a los antibióticos son capaces de sobrevivir y/o proliferar en presencia del antibiótico, en tanto que las células que no expresan el marcador de resistencia a los antibióticos no son capaces de sobrevivir y/o son incapaces de proliferar en presencia del antibiótico. Por ejemplo, un marcador seleccionable de este tipo que se utiliza comúnmente en células de plantas es la proteína NPTII, que codifica una proteína que proporciona resistencia contra el antibiótico kanamicina. Marcadores seleccionables adicionales incluyen proteínas que confieren resistencia contra la carbenicilina (v.g., β -lactamasas), proteínas que confieren resistencia contra la gentamicina (higromicina, etc.).

Una segunda clase no limitante de marcadores seleccionables son los marcadores nutricionales. Tales marcadores son generalmente enzimas que funcionan en un camino de biosíntesis para producir un compuesto que es necesario para el crecimiento o la supervivencia de la célula. En general, en condiciones no selectivas el compuesto requerido está presente en el ambiente o se produce en la célula por un camino alternativo. En condiciones selectivas, es necesario el funcionamiento del camino de biosíntesis en el cual está involucrado el marcador para producir el compuesto.

En general, un marcador seleccionable es un marcador cuya presencia en el interior de una célula puede detectarse por medios distintos del sometimiento de la célula a una condición selectiva o la medida directa del nivel del marcador propiamente dicho. Así, en general, la expresión de un marcador detectable dentro de una célula da como resultado la producción de una señal que puede ser detectada y/o medida. El proceso de detección o medida puede implicar el uso de reactivos adicionales y puede implicar el procesamiento de la célula. Por ejemplo, en el caso en que el marcador detectable es una enzima, la detección o medida del marcador implicará típicamente proporcionar un sustrato para la enzima. Preferiblemente, la señal es una señal fácilmente detectable tal como luz, fluorescencia, luminiscencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, productos de reacción enzimática, productos susceptibles de tinción, o color. Así, marcadores detectables preferidos para uso en la presente invención incluyen proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) y variantes de la misma. Otros marcadores adecuados incluyen luciferasa, proteína fluorescente amarilla (YFP), liquenasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, etc. Preferiblemente, el marcador detectable es uno que puede ser detectado en células vivas intactas de raíz y/o plantas.

Otro ejemplo de un vector viral preferido para uso en la presente invención es un vector AIMV en el cual está insertado un polinucleótido de interés, como se muestra en la Figura 5. Por ejemplo, el polinucleótido de interés puede reemplazar el componente codificante CP de AIMV en RNA3 de AIMV. La transcripción del polinucleótido de interés puede ponerse bajo control del promotor de CP de AIMV. Alternativamente, el polinucleótido puede reemplazar al componente codificante MP de AIMV, y su transcripción puede ponerse bajo control del promotor MP de AIMV. En otras realizaciones, el polinucleótido insertado no reemplaza secuencias virales endógenas. El polinucleótido de interés puede insertarse en marco con secuencias codificantes de CP (completas o parciales), de tal modo que se produce una proteína de fusión. En ciertas realizaciones de la invención, la proteína de fusión comprende un sitio de escisión entre la porción de CP y el resto, de tal modo que la proteína de fusión puede escindirse para proporcionar una proteína de interés exenta de secuencias CP (o que contiene solamente un pequeño número de tales secuencias). En ciertas realizaciones de la invención, la proteína de fusión se ensambla en partículas, lo que puede facilitar la purificación y/o presentación del antígeno (v.g., véanse las patentes U.S. Nos. 6.042.832 y 6.448.070).

Otro ejemplo adicional de un vector útil en la práctica de la presente invención es un vector viral del virus del mosaico de la coliflor (CMV) en el cual un polinucleótido de interés está insertado bajo control del promotor CP de CMV, reemplazando el componente codificante CP de CMV encontrado en el genoma del CMV existente naturalmente.

En ciertas realizaciones de la invención, es deseable insertar una porción de secuencia codificante o no codificante de un vector viral de un tipo de virus en un vector viral de otro tipo. Por ejemplo, ciertas secuencias pueden

5 aumentar la replicación o expresión, etc. Tales secuencias pueden comprender, por ejemplo, parte o la totalidad de una UTR 5' o 3' de un transcrito viral.

5 Generalmente, con objeto de preservar la función viral y también simplemente para facilitar la manipulación genética, los vectores virales se prepararán por alteración de un genoma de virus de planta existente, por ejemplo por eliminación de genes particulares y/o por interrupción o sustitución de secuencias particulares a fin de desactivar o reemplazar las mismas. En tales circunstancias, los vectores exhibirán identidad de secuencia muy alta con los genomas virales naturales. Por supuesto, pueden prepararse también vectores completamente nuevos, por ejemplo, por aislamiento separado de elementos genéticos deseados individuales y unión entre sí de los mismos, 10 opcionalmente con la inclusión de elementos adicionales. Debe indicarse que cuando se dice que un vector de virus de planta expresa afirmativamente una proteína o actividad particular necesaria para la replicación viral, el movimiento, o cualquier otra función viral, no es necesario que el gen relevante sea idéntico al gen correspondiente que se encuentra en la naturaleza. Con tal que la proteína sea funcional, aquél puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, generalmente se prefiere una identidad de secuencia muy alta con la proteína 15 natural. Por ejemplo, deberían evitarse por lo general deleciones largas (v.g., mayores que aproximadamente 25 aminoácidos), conforme a ciertas realizaciones de la invención. Típicamente, las proteínas virales expresadas de acuerdo con la presente invención exhibirán al menos 50%, preferiblemente 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la proteína viral natural correspondiente. Más particularmente, la proteína viral de inventiva debería exhibir típicamente 100% de identidad con porciones 20 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 indicará que en el caso de muchas proteínas, pueden hacerse varios cambios de aminoácidos sin afectar significativamente a la actividad funcional y/o diversas otras propiedades de la proteína tales como estabilidad, etc. 25 En particular, muchas proteínas toleran cambios de aminoácidos conservadores, es decir, la sustitución de un aminoácido con un aminoácido diferente que tiene propiedades similares (sustitución conservadora) en muchas posiciones sin reducción significativa de la actividad. La sustitución conservadora de aminoácidos es bien conocida en la técnica y representa un enfoque para obtener un polipéptido que tenga propiedades similares o sustancialmente similares a las de un polipéptido dado en tanto que se altera la secuencia de aminoácidos. En 30 general, los aminoácidos se han clasificado y dividido en grupos de acuerdo con (1) carga (positiva, negativa, o nula); (2) volumen y polaridad; (3) distancia físico-química de Grantham; y combinaciones de éstos. Véase, v.g., 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*, 4^a Ed., Stryer, L., et al., W. Freeman and Co., 1995; y la Patente U.S. No. 6.015.692. Por ejemplo, los aminoácidos pueden dividirse en las 6 categorías siguientes basadas en volumen y 35 polaridad: especiales (C), neutros y pequeños (A, G, P, S, T); polares y relativamente pequeños (N, D, Q, E); polares y relativamente grandes (R, H, K), no polares y relativamente pequeños (I, L, M, V), y no polares y relativamente grandes (F, W, Y). Una sustitución de aminoácido conservadora puede definirse como una que reemplaza un aminoácido con un aminoácido del mismo grupo. Así pues, pueden derivarse una diversidad de proteínas funcionalmente equivalentes por realización de una o más sustituciones de aminoácidos, v.g. sustituciones 40 conservadoras de aminoácidos, en una proteína viral dada.

C. Linajes de Raíz Clonales

45 La presente invención proporciona métodos para generar un linaje de raíces clonales en el cual se utiliza un vector viral de planta para dirigir la expresión de un polinucleótido de interés. Las figuras 6A-6E muestran los pasos del método conforme a ciertas realizaciones de la invención. Como se muestra en la *Figura 6*, uno o más vectores de expresión viral que incluye(n) un polinucleótido de interés enlazado operativamente a un promotor se introducen en una planta o una porción de la misma conforme a cualquiera de una diversidad de métodos conocidos. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2, pueden inocularse hojas de plantas con transcritos virales. Los vectores 50 propiamente dichos pueden aplicarse directamente a las plantas (v.g., por inoculaciones abrasivas, inoculaciones de pulverización mecanizada, infiltración a vacío, bombardeo con partículas, o electroporación). Alternativamente, se pueden preparar viriones (v.g., a partir de plantas ya infectadas), y pueden aplicarse a otras plantas conforme a técnicas conocidas.

55 En el caso de que la infección deba realizarse por aplicación directa de un genoma viral a una planta, puede utilizarse cualquier técnica disponible para preparar el genoma. Por ejemplo, muchos virus que se emplean útilmente conforme a la presente invención tienen genomas de ssRNA. El ssRNA se puede preparar por transcripción de una copia de DNA del genoma, o por replicación de una copia de RNA, sea *in vivo* o *in vitro*. Dada la fácil disponibilidad de sistemas de transcripción *in vitro* fáciles de utilizar (v.g., SP6, T7, lisado de reticulocitos, etc.), así como la 60 conveniencia del mantenimiento de una copia de DNA de un vector de RNA, es de esperar que se preparen a menudo vectores de ssRNA de inventiva por transcripción *in vitro*, particularmente con polimerasa T7 o SP6. Pueden utilizarse también clones infecciosos de cDNA. También se puede utilizar transferencia génica mediada por agrobacterias para transferir ácidos nucleicos virales tales como vectores virales (sea genomas virales enteros o porciones de los mismos) a células de plantas utilizando, v.g., agroinfiltración, de acuerdo con métodos conocidos en 65 la técnica.

Preferiblemente, la planta o porción de planta se mantiene luego (v.g., cultivada o desarrollada) en condiciones adecuadas para replicación del transcrito viral. En ciertas realizaciones de la invención, el virus se propaga más allá de la célula inoculada inicialmente, v.g., localmente de célula a célula y/o sistémicamente desde una hoja inoculada inicialmente a hojas adicionales. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención el virus no se propaga. Así, el vector viral puede contener genes que codifican MP y/o CP funcionales, pero puede carecer de uno o ambos de dichos genes. En general, el vector viral se introduce en (infecta) células múltiples en la planta o porción de la misma. La *Figura 6B* muestra una planta en la cual se ha introducido un vector viral (representado esquemáticamente en la *Figura 6A*).

Después de la introducción del vector viral en la planta, se cosechan las hojas. La *Figura 6C* muestra porciones de hoja después de ser cosechadas de una planta infectada por un virus. En general, las hojas pueden cosecharse en cualquier momento después de la introducción del vector viral. Sin embargo, puede ser preferible mantener la planta durante cierto periodo de tiempo después de la introducción del vector viral en la planta, v.g., un periodo de tiempo suficiente para la replicación viral y, opcionalmente, propagación del virus desde las células en las cuales se introdujo inicialmente. Se prepara un cultivo de raíz clonal (o cultivos múltiples), v.g., por métodos conocidos descritos adicionalmente más adelante y en el Ejemplo 2.

En general, puede utilizarse cualquier método adecuado para preparar un cultivo de raíz clonal a partir de una planta o tejido de planta en el cual se ha introducido un vector viral. Un método de esta clase emplea genes que existen en ciertos plásmidos bacterianos. Estos plásmidos se encuentran en diversas especies de *Agrobacterium* que infectan y transfieren DNA a una gran diversidad de organismos. Como género, las *Agrobacterias* pueden transferir DNA a un conjunto grande y diverso de tipo de plantas que incluyen numerosas especies de angiospermas y dicotiledóneas y monocotiledóneas gimnospermas (véase, Gelvin, S.B., "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1): 16-37 (2003) y las referencias citadas en dicho lugar, todas las cuales se incorporan en esta memoria por referencia). La base molecular de la transformación genética de células de plantas es la transferencia desde la bacteria y la integración en el genoma nuclear de la planta de una región de un plásmido grande inductor de tumores (Ti) o rizogénico (Ri) que reside en varias especies de *Agrobacteria*. A esta región se hace referencia como la región T cuando está presente en el plásmido y como T-DNA cuando está escindida del plásmido. Generalmente, una molécula de T-DNA monocatenaria se transfiere a la célula de la planta en la infección de *Agrobacteria* existente naturalmente y se incorpora finalmente (en forma bicatenaria) en el genoma. Sistemas basados en plásmidos TI se utilizan ampliamente para introducción de material genético extraño en plantas y para producción de plantas transgénicas.

La infección de plantas con diversas especies de *Agrobacteria* y transferencia del T-DNA produce varios efectos. Por ejemplo, *A. tumefaciens* causa la enfermedad de agallas de la corona, mientras que *A. rhizogenes* causa el desarrollo de raíces pilosas en el sitio de infección, una condición conocida como "enfermedad de raíces pilosas". Cada raíz surge de una sola célula transformada genéticamente. Así, las células de raíz en las raíces son clonales, y cada raíz representa una población clonales de células. Las raíces producidas por infección de *A. rhizogenes* se caracterizan por una elevada tasa de crecimiento y estabilidad genética. (Giri, A. y Narasu, M.L., *Biotechnology Advances*, 18:1-22 (2000) y las referencias citadas en dicho lugar, todas las cuales se incorporan en esta memoria por referencia). Adicionalmente, tales raíces son capaces de regenerar plantas genéticamente estables (Giri 2000).

En general, la presente invención abarca el uso de cualquier cepa de *Agrobacteria*, particularmente cepas de *A. rhizogenes*, que es capaz de inducir la formación de raíz a partir de células de planta. Como se ha mencionado arriba, una porción del plásmido Ri (DNA de Ri) es responsable de causar la enfermedad de raíces pilosas. Si bien la transferencia de esta porción del plásmido Ri a células de plantas puede realizarse convenientemente por infección con *Agrobacteria* que albergan el plásmido Ri, la invención abarca también el uso de métodos alternativos de introducción de la región relevante en una célula de planta. Tales métodos incluyen cualquier método disponible de introducción de material genético en células de plantas con inclusión, pero sin carácter limitante, de biolística, electroporación, absorción de DNA mediada por PEG, vectores basados en Ti, etc. Las porciones relevantes del T-DNA de Ri pueden introducirse también en células de plantas por el uso de un vector viral. Los genes Ri pueden incluirse en el mismo vector que contiene el polinucleótido de interés o en un vector viral diferente, que puede ser el mismo o un tipo diferente del tipo del vector que contiene el polinucleótido de interés. Debe indicarse que el T-DNA de Ri entero puede no ser requerido para la producción de raíces pilosas, y la invención abarca el uso de porciones del T-DNA de Ri, con la condición de que tales porciones contengan suficiente material genético para inducir la formación de raíces, como es conocido en la técnica. Material genético adicional, v.g., genes presentes en el plásmido Ri pero no en el T-DNA, puede transferirse también a la célula de la planta de acuerdo con la invención, particularmente genes cuyos productos de expresión facilitan la integración de T-DNA en el DNA de la célula de la planta.

Con objeto de preparar un linaje de raíces clonales de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, las porciones de hoja cosechadas se ponen en contacto con *A. rhizogenes* en condiciones adecuadas para infección y transformación. El Ejemplo 2 describe un método de generación de linajes de raíz a partir de hojas en las cuales se ha introducido un vector viral. Las porciones de hoja se mantienen en cultivo para hacer posible el desarrollo de raíces pilosas. La *Figura 6D* muestra raíces pilosas generadas por células individuales en porciones de hoja infectadas con *A. rhizogenes*. Cada raíz es clonales, es decir, las células en la raíz se derivan de una sola

célula ancestral a la cual se transfirió T-DNA de Ri. De acuerdo con la invención, una porción de tales células ancestrales contendrá también el vector viral. Así, las células en una raíz derivadas de dicha célula ancestral contendrán también el vector viral, dado que éste se replicará y se transmitirá durante la división celular. Por tanto, una proporción elevada, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o la totalidad (100%) o sustancialmente la totalidad (al menos 98%) de las células contendrán el vector viral. Debe indicarse que, dado que el vector viral es heredado por las células hijas en la raíz clonales, el movimiento del vector viral dentro de la raíz no es necesario para mantener el vector viral en toda la raíz.

Las raíces pilosas clonales individuales pueden eliminarse de la porción de hoja y cultivarse ulteriormente, como se muestra en las Figuras 6E y 6F. A dichas raíces se hace referencia también en esta memoria como linajes de raíz. La Figura 6E muestra raíces clonales individuales alineadas en una cápsula Petri. La Figura 6F muestra los mismos linajes de raíz con mayor aumento. Las raíces continúan creciendo. Estas raíces se derivaban de plantas en las cuales se había introducido un vector viral que contenía un gen GFP. La Figura 6G muestra una fotografía de una raíz simple tomada bajo luz UV. La expresión de GFP en toda la raíz es evidente.

Como se describe en los ejemplos 2-4, se han generado una diversidad de linajes de raíz clonales diferentes utilizando los métodos de inventiva. Estos linajes de raíz se generaron utilizando vectores virales que contenían polinucleótidos de interés que codificaban GFP, hGH, y GCSF. Los linajes de raíz se ensayaron por transferencia Western. Los linajes de raíz exhibían una diversidad de niveles de expresión diferentes de los diversos polipéptidos. Los linajes de raíz que exhibían expresión alta se seleccionaron y se cultivaron ulteriormente. Estos linajes de raíz se ensayaron subsiguientemente una vez más y se demostró que mantendrían niveles de expresión altos durante periodos de tiempo prolongados, lo que indicaba estabilidad. El nivel de expresión era comparable a o mayor que la expresión en plantas intactas infectadas con el mismo vector viral utilizado para generar los linajes de raíz clonales. Adicionalmente, la estabilidad de expresión de los linajes de raíz era superior a la obtenida en plantas infectadas con el mismo vector viral. Hasta 80% de tales plantas infectadas con virus volvía al tipo salvaje después de 2-3 pases. (Dichos pases implicaban inocular plantas con transcritos, dejar que la infección (local o sistémica) llegara a estabilizarse, tomar una muestra de hoja, e inocular plantas nuevas que se ensayan posteriormente en cuanto a expresión.)

Los linajes de raíz pueden cultivarse en gran escala para producción de polipéptidos de interés como se expone adicionalmente más adelante. Se indicará que los linajes de raíz clonales (y los linajes de células derivados de los linajes de raíz clonales) pueden mantenerse generalmente en un medio que no incluye diversos compuestos, v.g., hormonas de crecimiento de plantas tales como auxinas, citoquininas, etc., que se emplean típicamente en el cultivo de células de raíz y células de plantas. Esta característica reduce notablemente el gasto asociado con el cultivo de tejidos, y los autores de la invención esperan que ello contribuya significativamente a la factibilidad económica de producción de proteínas utilizando plantas.

Puede utilizarse cualquiera de una diversidad de métodos para seleccionar raíces clonales que expresan un polinucleótido de interés. Pueden utilizarse transferencias Western, ensayos ELISA, etc., para detectar un polipéptido codificado. En el caso de marcadores detectables tales como GFP, pueden realizarse métodos alternativos tales como cribados visuales. Si se utiliza un vector viral que contiene un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable, puede imponerse una selección apropiada (v.g., el material de hoja y/o raíces derivadas del mismo pueden cultivarse en presencia de un antibiótico o condición nutricional apropiado(a) e identificar y aislar las raíces supervivientes). Ciertos vectores virales contienen dos o más polinucleótidos de interés, v.g., dos o más polinucleótidos que codifican polipéptidos diferentes. Si uno de éstos es un marcador seleccionable o detectable, las raíces clonales que se seleccionan o detectan por selección para o detección de la expresión del marcador tendrán una probabilidad alta de expresar también el segundo polinucleótido. El cribado de linajes de raíz que contienen polinucleótidos particulares puede realizarse también utilizando PCR u otros métodos de detección de ácido nucleico.

Alternativamente, los linajes de raíz clonales pueden cribarse también en cuanto a la presencia del virus por inoculación de plantas hospedadoras que formarán lesiones locales como resultado de la infección por el virus (v.g., plantas hospedadoras hipersensibles). Por ejemplo, 5 mg de tejido de raíz pueden homogeneizarse en 50 µL de tampón de fosfato y utilizarse para inocular una sola hoja de una planta de tabaco. Si el virus está presente en los cultivos de raíz, en el transcurso de 2 a 3 días aparecerán lesiones características en las hojas infectadas. Esto significa que el linaje de raíz contiene virus recombinante que es portador del polinucleótido de interés (gen diana). Si no se forman lesiones locales, no existe virus alguno, y el linaje de raíz se rechaza como negativo. Este método es altamente eficiente en tiempo y costes. Después del cribado inicial respecto a la presencia de virus, las raíces que contienen el virus se someten a cribado secundario, v.g., por transferencia Western o ELISA para seleccionar expresantes fuertes. Pueden aplicarse también cribados adicionales, v.g., cribados en cuanto a crecimiento rápido, crecimiento en medios particulares o en condiciones ambientales particulares, etc. Estos métodos de cribado pueden, en general, aplicarse en el desarrollo de cualquiera de los linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales, y/o plantas clonales descritos en esta memoria.

Como será evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica, pueden hacerse una diversidad de modificaciones en la descripción anterior de los métodos de inventiva para generación de linajes de raíces clonales

que contienen un vector viral. Tales modificaciones están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, si bien se prefiere generalmente introducir el vector viral en una planta intacta o porción de la misma antes de la introducción de los genes DNA de Ri, en ciertas realizaciones de la invención se introduce el Ri-DNA antes de introducir el vector viral. Adicionalmente, es posible también poner en contacto plantas intactas con *A. rhizogenes* en lugar de cosechar las porciones de hoja y exponerlas luego a la bacteria.

Otros métodos de generación de linajes de raíz clonales a partir de células simples de la planta o porción de la misma que albergan el vector viral pueden utilizarse también (a saber, métodos que no utilizan *A. rhizogenes* o material genético del plásmido Ri). Por ejemplo, es sabido que el tratamiento con ciertas hormonas de plantas o combinaciones de hormonas de plantas da como resultado la generación de raíz a partir del tejido de planta.

En ciertas realizaciones de la invención, en lugar de introducir un vector viral simple en la planta, se introducen vectores virales múltiples diferentes. Tales vectores pueden, por ejemplo, trans-complementarse unos a otros con respecto a funciones tales como replicación, movimiento célula-a-célula y/o movimiento a larga distancia. Los vectores pueden contener diferentes polinucleótidos de interés, v.g., polinucleótidos que codifican polipéptidos individuales que se asocian para formar un complejo proteínico simple tales como anticuerpos, etc., o polinucleótidos que codifican enzimas diferentes en un camino biosintético. La selección de raíz que expresan polipéptidos de interés múltiples puede realizarse como se ha descrito arriba para polinucleótidos o polipéptidos simples.

D. Linajes de Células Clonales Derivados de Linajes de Raíz Clonales

Como se ha descrito arriba, la invención proporciona métodos para generación de linajes de raíz clonales, en donde las células de los linajes de raíz contienen un vector viral. Como es bien conocido en la técnica, una diversidad de linajes de células diferentes pueden generarse a partir de raíz. Por ejemplo, pueden generarse linajes de células de raíz a partir de células de raíz individuales obtenidas a partir de la raíz utilizando una diversidad de métodos conocidos. Tales linajes de células de raíz pueden obtenerse a partir de diversos tipos de células de raíz diferentes dentro de la raíz. En general, el material de raíz se cosecha y se disocia (v.g., se digiere física y/o enzimáticamente) para liberar células de raíz individuales, que se cultivan luego adicionalmente. La formación de protoplastos completos no es necesaria por regla general. Si se desea, las células de raíz pueden extenderse en placas a concentraciones de células muy diluidas, a fin de obtener linajes de células de raíz a partir de células de raíz simples. Los linajes de células de raíz derivados de este modo son linajes de células de raíces clonales que contienen el vector viral. Tales linajes de células de raíz exhiben por tanto expresión estable del polinucleótido de interés. Los linajes de células de plantas clonales pueden obtenerse también de manera similar a partir de las raíces clonales, v.g., por cultivo de células de raíz disociadas en presencia de las hormonas de planta apropiadas. Pueden utilizarse cribados y tandas sucesivas de enriquecimiento para identificar linajes de células que expresan el polinucleótido de interés a niveles altos. No obstante, si el linaje de raíces clonales del que se deriva el linaje de células se expresa ya a niveles altos, tales cribados adicionales pueden ser innecesarios.

Como en el caso de los linajes de raíces clonales, las células de un linaje de células de raíces clonales se derivan de una sola célula ancestral que contiene el vector viral y por tanto, contendrán también el vector viral dado que el mismo se replicará y se transmitirá durante la división celular. Así, una proporción elevada, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o la totalidad (100%) o sustancialmente la totalidad (al menos 98%) de las células contendrán el vector viral. Debe indicarse que dado que el vector viral es heredado por las células hijas dentro del linaje de células de raíces clonales, el movimiento del vector viral entre las células no es necesario para mantener el vector viral. Los linajes de células de raíces clonales pueden utilizarse para producción de un polinucleótido de interés como se describe más adelante.

E. Linajes de Células de Plantas Clonales

La presente invención proporciona métodos para generar un linaje de células de plantas clonales en el cual se utiliza un vector viral de plantas para dirigir la expresión de un polinucleótido de interés. De acuerdo con el método de inventiva, uno o más vectores de expresión viral que incluyen un polinucleótido de interés enlazado operativamente a un promotor se introduce en las células de un linaje de células de plantas que se mantiene en cultivo de células. Se conocen en la técnica cierto número de linajes de células de plantas de diversos tipos de planta, cualquiera de los cuales puede utilizarse. Linajes de células recién derivados pueden generarse también de acuerdo con métodos conocidos para uso en la práctica de la invención. Un vector viral se introduce en las células del linaje de células de plantas de acuerdo con cualquiera de cierto número de métodos. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5, pueden producirse protoplastos e introducirse luego los transcritos virales en las células por electroporación. Pueden utilizarse también otros métodos de introducción de un vector viral de planta en células de un linaje de células de plantas.

La Figura 13 muestra los pasos de un método para generación de linajes de células de plantas clonales de acuerdo con la invención. La Figura 13A muestra un vector viral adecuado para introducción en células de plantas (v.g., protoplastos). Después de la introducción del vector viral, el linaje de células de plantas puede mantenerse en cultivo de tejido, v.g., como se muestra en las Figuras 13B y 13C. Durante este tiempo, el vector viral puede replicarse, y pueden expresarse polinucleótidos de interés. Linajes de células de plantas clonales se derivan del cultivo, v.g., por

un proceso de enriquecimiento sucesivo. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 13E, pueden extraerse muestras del cultivo, opcionalmente con dilución de tal modo que la concentración de células sea baja, y extenderse en placa en cápsulas Petri en gotitas individuales. Las gotitas se mantienen luego para permitir la división celular.

5 Se apreciará que las gotitas pueden contener un número variable de células, dependiendo de la densidad inicial del cultivo y la cantidad de dilución. Las células pueden diluirse de tal modo que la mayoría de las gotitas contengan 0 ó 1 célula si se desea obtener linajes de células clonales que expresen el polinucleótido de interés después de una sola tanda de enriquecimiento. No obstante, puede ser más eficiente seleccionar una concentración tal que estén presentes células múltiples en cada gotita y cribar luego las gotitas para identificar aquéllas que contienen células expresantes. En general, se puede emplear cualquier procedimiento de cribado apropiado. Por ejemplo, puede utilizarse la selección o detección de un marcador detectable tal como GFP. La Figura 13F es una fotografía tomada bajo luz UV y que muestra gotitas individuales en las cuales están presentes linajes de células que expresan GFP a partir de un vector viral. Pueden utilizarse también transferencias Western o ensayos ELISA. Las gotitas individuales (100 µL) contienen un número de células mayor que el suficiente para realización de estos ensayos. Se realizan tandas múltiples de enriquecimiento para aislar linajes de células expresantes sucesivamente mayores. Pueden generarse linajes de células de plantas clonales simples (es decir, porciones derivadas de una sola célula ancestral) por dilución limitante posterior utilizando métodos estándar para clonación de células simples. No obstante, no es necesario aislar linajes clonales individuales. Una población que contenga linajes de células clonales múltiples puede utilizarse también para expresión de un polinucleótido de interés.

20 En general, ciertas consideraciones arriba descritas para generación de linajes de raíz clonales son aplicables también a la generación de linajes de células de plantas clonales. Por ejemplo, pueden utilizarse una diversidad de vectores virales que contienen uno o más polinucleótidos de interés, al igual que pueden utilizarse combinaciones de vectores múltiples diferentes. Pueden utilizarse también métodos de cribado similares. Como en el caso de los linajes de raíz clonales y los linajes de células de raíces clonales, las células de un linaje de células de plantas clonales se derivan de una sola célula ancestral que contiene el vector viral y por consiguiente, contendrán también el vector viral, dado que el mismo se replicará y se transmitirá durante la división celular. Así pues, una elevada proporción, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o la totalidad (100%) o sustancialmente la totalidad (al menos 98%) de las células contendrán el vector viral. Debe indicarse que, dado que el vector viral es heredado por las células hijas dentro del linaje de células de plantas clonales, el movimiento del vector viral entre las células no es necesario para mantener el vector viral. El linaje de células de plantas clonales puede utilizarse para producción de un polipéptido de interés como se describe más adelante.

35 *F. Plantas Clonales*

Pueden generarse plantas clonales a partir de las raíces clonales, linajes de células de raíces clonales, y/o linajes de células de plantas clonales producidos de acuerdo con los diversos métodos arriba descritos. Los métodos para la generación de plantas a partir de raíz, linajes de células de raíz, y linajes de células de plantas tales como los linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, y linajes de células de plantas clonales descritos en esta memoria son bien conocidos en la técnica (véase, v.g., Peres et al., *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 65, 37-44, 2001 y los trabajos de referencia estándar sobre biología molecular y biotecnología de plantas citados en otro lugar de esta memoria. La invención proporciona por tanto un método de generación de una plantas clonales que comprende pasos de (i) generación de un linaje de raíces clonales, linaje de células de raíces clonales, o linaje de células de plantas clonales de acuerdo con cualquiera de los métodos de inventiva arriba descritos; y (ii) generación de una planta entera a partir del linaje de raíces clonales, linaje de células de raíces clonales, o plantas clonales. Las plantas clonales pueden propagarse y crecer de acuerdo con métodos estándar. El Ejemplo 7 describe generación de una plantas clonales a partir de un linaje de raíces clonales que contiene un vector viral que codifica la hormona del crecimiento humana.

50 Como en el caso de los linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales, las células de una plantas clonales se derivan de una sola célula ancestral que contiene el vector viral y, por consiguiente, contendrán también el vector viral, dado que éste se replicará y se transmitirá durante la división celular. Así, una proporción elevada, con preferencia al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o la totalidad (100%) o sustancialmente la totalidad (al menos 98%) de las células contendrán el vector viral. Debe indicarse que, dado que el vector viral es heredado por las células hijas dentro de las plantas clonales, el movimiento del vector viral no es necesario para mantener el vector viral.

60 *II. Especies de Plantas*

Cualquier planta susceptible de infección viral puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. En general, a menudo será deseable utilizar plantas que son susceptibles de crecimiento en condiciones definidas, por ejemplo en un invernadero y/o en sistemas acuosos. Puede ser deseable también seleccionar plantas que no son consumidas típicamente por los seres humanos o los animales domésticos y/o no forman típicamente parte de la cadena alimentaria humana, de tal modo que las mismas pueden crecer en exteriores sin precaución de que el

polinucleótido expresado pueda ser ingerido indeseablemente. No obstante, en otras realizaciones será deseable emplear plantas comestibles.

5 A menudo, ciertas características deseables de la planta estarán determinadas por el polinucleótido particular a expresar. Para ofrecer solamente unos pocos ejemplos, cuando el polinucleótido codifica una proteína que debe producirse con rendimiento elevado (como será el caso a menudo, por ejemplo cuando deben expresarse proteínas terapéuticas), será deseable a menudo seleccionar plantas con biomasa relativamente alta (v.g., tabaco, que tiene las ventajas adicionales de que es altamente susceptible de infección viral, tiene un periodo de crecimiento corto, y no se encuentra en la cadena alimentaria humana). En el caso en que el polinucleótido codifica una proteína cuya actividad plena requiere (o es inhibida por) una modificación particular posterior a la traducción, la capacidad (o incapacidad) de ciertas especies de plantas para realizar la modificación relevante (v.g., una glicosilación particular) puede dirigir la selección.

15 En ciertas realizaciones preferidas de la invención, se utilizan plantas de cosecha, o plantas relacionadas con cosechas. En algunas realizaciones particularmente preferidas, se utilizan plantas comestibles.

20 Plantas preferidas para uso de acuerdo con la presente invención incluyen Angiospermas, Briofitas (v.g., Hepáticas, Musgos, etc.), Pteridofitas (v.g., helechos, equisetos, licopodios), Gimnospermas (v.g., Coníferas, Cicasa, Ginko, Gnetales), y Algas (v.g., Clorofíceas, Feofíceas, Rodofíceas, Mixofíceas, Xantofíceas, y Euglenofíceas). Se prefieren particularmente miembros de la familia Leguminosas (Fabáceas; v.g., guisante, alfalfa, soja); Gramíneas (Poáceas; v.g., maíz, trigo, arroz); Solanáceas, particularmente del género *Lycopersicon* (v.g., tomate), *Solanum* (v.g., patata, berenjena), *Capsium* (v.g. pimiento), o *Nicotiana* (v.g. tabaco); Umbelíferas, particularmente del género *Daucus* (v.g., zanahoria), *Apium* (v.g., apio), o *Rutáceas* (v.g., naranjas); Compuestas, particularmente del género *Lactuca* (v.g., lechuga); Brasicáceas (Crucíferas), particularmente de los géneros *Brassica* o *Sinapis*. Miembros particularmente preferidos de la familia Brasicáceas incluyen *Brassica campestris*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleraceae*, *B. tournifortii*, *Sinapis alba*, y *Raphanus sativus*.

III. Polinucleótidos y Polipéptidos de Interés

30 La doctrina de la presente invención puede emplearse para suministrar a y/o expresar en células de plantas cualquier polinucleótido de interés. Por ejemplo, polinucleótidos codificantes de proteínas pueden expresar enzimas, anticuerpos, hormonas, citocinas, factores de regulación, proteínas estructurales, o cualquier otra proteína o polipéptido de interés. Las proteínas codificadas pueden ser proteínas existentes naturalmente, o pueden ser proteínas diseñadas o manipuladas genéticamente, incluyendo por ejemplo proteínas de fusión (v.g., proteínas de fusión que incorporan parte o la totalidad de una proteína de virus de planta tal como MP o CP). Véanse, v.g., los documentos U.S. Pat. Nos. 6.448.070 y 6.660.500. Pueden codificarse numerosos tipos de proteínas de fusión. Una secuencia heteróloga puede fusionarse al extremo 5' o 3' de una proteína de virus de plantas o localizada internamente. Numerosas secuencias de origen diverso pueden incluirse dentro de una sola proteína de fusión. La proteína codificada puede comprender un sitio de escisión, que puede estar codificado por el polinucleótido insertado o por el vector viral. Véase, v.g., U.S. Pat. No. 6.740.740. Por ejemplo, el vector puede comprender una porción que codifica un sitio de escisión aguas arriba de una porción que codifica CP de tal modo que cuando un polinucleótido de interés se inserta entre el promotor CP y la porción que codifica un sitio de escisión, el marco de lectura abierto resultante codifica una proteína de fusión que contiene una porción codificada por el polinucleótido de interés, un sitio de escisión, y parte o la totalidad de la CP. La escisión de la proteína de fusión en el sitio de escisión libera el polipéptido de interés codificado. El sitio de escisión puede ser un sitio para escisión por medios químicos (v.g., bromuro de cianógeno) o por medios enzimáticos (v.g., por una proteasa tal como tripsina, quimotripsina, trombina, pepsina, la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, y la proteasa del Factor Xa).

50 En ciertas realizaciones de la invención, el polinucleótido de interés comprende una porción que codifica una etiqueta, v.g., una etiqueta 6X-His, etiqueta HA, etiqueta Myc, etiqueta FLAG, etc. Tales etiquetas pueden simplificar la detección, el aislamiento y/o la purificación de la proteína. En ciertas realizaciones de la invención, la etiqueta es una etiqueta escindible, v.g., una etiqueta escindible por medios químicos o por medios enzimáticos como se ha descrito arriba. La inclusión de un sitio de escisión permite que la etiqueta se separe fácilmente del polipéptido traducido, v.g., después de la purificación, dando como resultado una proteína con secuencia de tipo salvaje. Debe entenderse que la etiqueta y/o el sitio de escisión pueden estar presentes dentro de un vector viral en el cual debe insertarse un polinucleótido particular de interés y no precisa estar presente dentro del polinucleótido insertado propiamente dicho. Una vez que se inserta el polinucleótido, la porción entera que comprende la o las regiones que codifica(n) la etiqueta, el sitio de escisión, y el polinucleótido recién insertado se considera un polinucleótido de interés.

60 En algunos casos, puede ser deseable utilizar el sistema de inventiva para expresar más de una cadena polipeptídica en la misma raíz clonal o linaje de células de plantas o plantas clonales (v.g., utilizando dos vectores virales diferentes cada uno de los cuales dirige la expresión de un polinucleótido, insertando dos polinucleótidos diferentes en un solo vector viral, utilizando una planta transgénica que expresa uno o más polinucleótidos para generar una raíz clonal o linaje de células de plantas o plantas clonales), por ejemplo a fin de producir una proteína

65

multímera o para producir simultáneamente dos proteínas diferentes tales como una proteína de interés y un marcador detectable o seleccionable).

En ciertas realizaciones preferidas de la invención, se emplea un polinucleótido que codifica una proteína terapéuticamente activa. Proteínas ilustrativas que han sido aprobadas para usos terapéuticos incluyen, por ejemplo, insulina, hormona del crecimiento humana, interferones, albúmina, tPA, eritropoyetina, interleucinas, factor VIII, DNasa, Factor IX, PDGF, FSH, receptor TNF (forma soluble), calcitonina, y una diversidad de inmunoglobulinas. Por supuesto, la invención no está limitada a tales proteínas aprobadas, sino que abarca la expresión de cualquier o cualesquiera polinucleótido(s), sean codificantes de proteína o no, y abarca particularmente la expresión de cualquier polinucleótido que codifique cualquier proteína terapéuticamente activa, sea de origen procariota o eucariota, etc.

Generalmente, las proteínas farmacéuticas de interés incluyen, pero sin carácter limitante, hormonas (insulina, hormona tiroidea, catecolaminas, gonadotropinas, hormonas tróficas, prolactina, oxitocina, dopamina, somatotropina de bovino, leptinas y análogas), hormonas del crecimiento (v.g., hormona del crecimiento humana, factores de crecimiento (v.g. factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento semejante a insulina y análogos), receptores de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas del sistema inmunitario (v.g., interleucinas, factor estimulante de colonias (CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, factor de necrosis tumoral (TNF), interferones, integrinas, adresinas, selectinas, receptores de retorno, receptores de células T, inmunoglobulinas, antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad solubles, antígenos inmunológicamente activos tales como antígenos bacterianos, parasitarios, o virales o alérgenos), autoantígenos, anticuerpos), enzimas (activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, enzimas biosintéticas o degradantes del colesterol, esteroidogénicas, quinasas, fosfodiesterasas, metilasas, desmetilasas, deshidrogenasas, celulasas, proteasas, lipasas, fosfolipasas, aromatasas, citocromos, adenilato- o guanilato-ciclasas, neuramididasas y análogas), receptores (receptores de hormonas esteroidales, receptores peptídicos), proteínas de fijación (proteínas de fijación de esteroides, hormona del crecimiento o proteínas de fijación de factores de crecimiento y análogas), factores de transcripción y traducción, oncoproteínas o protooncoproteínas (v.g., proteínas del ciclo celular), proteínas musculares (miosina o tropomiosina y análogas), mieloproteínas, proteínas neuroactivas, proteínas supresoras del crecimiento de tumores (angiostatina o endostatina, las dos cuales inhiben la angiogénesis), proteínas anti-sepsis (proteína bactericida aumentadora de la permeabilidad), proteínas estructurales (tales como colágeno, fibroína, fibrinógeno, elastina, tubulina, actina, y miosina), proteínas de la sangre (trombina, seroalbúmina, Factor VII, Factor VIII, insulina, Factor IX, Factor X, activador del plasminógeno tisular, proteína C, factor von Willebrand, antitrombina III, glucocerebrosidasa, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) o Factor VIII modificado, anticoagulantes tales como hirudina) y análogos.

En un ejemplo particular, la presente invención se puede utilizar para producir componentes de vacuna. En general, es deseable incluir en las vacunas proteínas, o porciones de proteínas, a las cuales se ve expuesto un sistema inmune humano o animal cuando el humano o animal se infecta con un patógeno, o que sufre algún otro evento indeseable (v.g., desarrollo de un tumor). Así, las proteínas o polipéptidos que pueden formularse en una vacuna incluyen virtualmente cualquier proteína potencialmente antigénica o porción de la misma, por ejemplo, proteínas de la cubierta viral, proteínas de fusión virales, proteínas de la envoltura viral, glicoproteínas virales, proteínas de la pared celular bacteriana o fúngica, proteínas toxina, proteínas de la cubierta parasitaria, antígenos específicos de tumor, etc., o porciones de cualquiera de los anteriores (véase, v.g., WO 9640229). Virus de interés incluyen HIV, virus respiratorio sincitial (RSV), virus de la rabia, poliovirus, neumovirus, metaneumovirus, virus de la gripe, poxvirus (con inclusión de la viruela), rinovirus, coronavirus, adenovirus, herpesvirus, hantavirus, virus Ébola, virus de la Fiebre Amarilla, virus del Dengue, virus de la hepatitis (v.g. virus de la hepatitis A, B, C, D, E, F, o G) etc. Bacterias de interés incluyen *Neisseria*, *Neumococcus*, *Streptococcus*, *H. influenzae*, *Staphylococcus*, ántrax, etc. Parásitos de interés incluyen *Plasmodium*, *Leishnzania*, *Toxoplasma*, *Ascaris* anquilostoma y otros nematodos, amebas, trematodos, etc.

En otras realizaciones, el sistema de inventiva puede utilizarse para expresar un polinucleótido que codifica una enzima que sintetiza o modifica un agente biológicamente activo. Por ejemplo, ciertas enzimas (v.g., poliquetido-sintasas, polipéptido-sintasas, sintasas terpénicas, etc.) sintetizan pequeñas moléculas con actividades biológicas interesantes, que incluyen actividades terapéuticas (v.g., actividades antibióticas, anticáncer, inmunosupresoras, etc.). Asimismo, se conocen un gran número de enzimas que modifican sustratos de proteínas o moléculas pequeñas (v.g., quinasas, hidrolasas, transferasas, etc.). Véase Patente U.S. No. 6.500.644 para proteínas adicionales que pueden ser expresadas deseablemente en plantas utilizando los sistemas de inventiva descritos en esta memoria.

En ciertas realizaciones de la invención, el polinucleótido codifica un componente (v.g., una enzima) en un camino biosintético. Las plantas son una fuente de numerosos productos naturales de uso para propósitos medicinales y/o industriales y otros. Es interesante aumentar el nivel o la eficiencia por la cual se fabrican tales productos. A este fin, un polinucleótido de interés puede codificar una enzima biosintética, v.g., una enzima que cataliza un paso limitante de la velocidad en un camino biosintético, por el cual se sintetiza(n) dicho o dichos productos naturales.

En otras realizaciones, puede utilizarse el sistema de inventiva para producir reactivos de diagnóstico o investigación que incluyen, por ejemplo, anticuerpos.

En otras realizaciones adicionales de la invención, el polinucleótido codifica una proteína que aumenta el crecimiento o la supervivencia de la planta por cualquiera de una diversidad de vías. Por ejemplo, la proteína puede intensificar la capacidad de la planta para extraer nutrientes del suelo o medio de cultivo, puede conferir resistencia a una condición ambiental tal como temperatura, salinidad, etc., o puede conferir resistencia a un patógeno tal como un virus, bacteria, hongo, nematodo, insecto, etc. Un ejemplo lo constituyen los diversos péptidos de plantas conocidos como defensinas (Thomna, B.P. et al., *Planta*, 216(2): 193-202, 2002). Tales proteínas incluyen a la vez proteínas endógenas de plantas (es decir, proteínas que son expresadas naturalmente en la planta de la cual se deriva el linaje de raíces clonales, el linaje de células de plantas clonales, o la planta clonales) y proteínas no endógenas.

En otras realizaciones adicionales, el sistema de inventiva puede utilizarse para producir proteínas u otros productos nutricionalmente relevantes. Proteínas nutricionalmente relevantes incluyen, por ejemplo, proteínas que se encuentran naturalmente en los alimentos consumidos por humanos o animales domésticos (v.g., gatos, perros). Otros ejemplos incluyen proteínas que tienen una composición de aminoácidos equilibrada (v.g., proteínas que tienen una composición de aminoácidos tal como los utilizados para nutrición parenteral total (TPN), etc.

En otras realizaciones adicionales, el sistema de inventiva puede utilizarse para expresar polinucleótidos que no codifican necesariamente proteínas, por ejemplo para producir especies de RNA activas, v.g., ribozimas o RNAs de interferencia que silencian la expresión génica (sea RNAs bicatenarios largos o RNAs interferentes cortos (siRNAs), microRNAs o precursores de microRNA, RNAs de horquilla corta (shRNAs), etc. Véanse, v.g., U.S. Pat. No. 6.531.647; 6.635.805 y U.S. Pub. No. 20040019930. En algunas realizaciones, pueden producirse ribozimas o RNAs de interferencia que están direccionados a genes de plantas, de tal modo que se crea una planta alterada, por ejemplo que no expresa un receptor particular para un patógeno de planta, o una proteína alergénica particular.

IV. Cultivo de Linajes de Raíces Clonales, Linajes de Células de Raíz Clonal, Linajes de Células de Plantas Clonales, y Plantas Clonales en Crecimiento

En general, los métodos estándar conocidos en la técnica pueden utilizarse para cultivar o desarrollar los linajes de raíz clonales, linajes de células de raíces clonales, linajes de células de plantas clonales, y plantas clonales de la invención. Una gran diversidad de medios de cultivo y biorreactores han sido empleados para cultivar células de raíz pilosa, linajes de células de raíz, y células de planta. Véase, por ejemplo, Giri, A. y Narasu, M.L., *Biotechnol. Adv.* 18:1-22, 2000; Rao, S.R. y Ravishankar, G.A., *Biotechnol. Adv.* 20:101-153, 2002, y las referencias en ambos artículos citados, todos los cuales se incorporan en esta memoria por referencia. Las plantas clonales pueden dejarse crecer de cualquier manera adecuada.

V. Aislamiento y/o Formulación de Productos de Expresión de Polinucleótidos

En muchas realizaciones de la presente invención, será deseable aislar productos de expresión de polinucleótidos a partir del o de los tejidos de planta, v.g., raíces, células de raíz, plantas, células de plantas, que los expresan. Puede ser deseable también formular tales productos aislados para su uso propuesto (v.g., como agente farmacéutico o de diagnóstico, o como reactivo, etc.). En otras realizaciones, será deseable formular los productos junto con algunos o la totalidad de los tejidos de planta que expresan los mismos.

Cuando es deseable aislar el producto de expresión de alguna o la totalidad de las células o tejidos de plantas que expresan el mismo, se pueden emplear cualesquiera técnicas de purificación disponibles. Las personas con experiencia ordinaria en la técnica están familiarizadas con una amplia gama de procedimientos de fraccionamiento y separación (véase, por ejemplo, Scopes et al., *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Ed., Janson et al., 1993; *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 esta memoria por referencia). A menudo, será deseable hacer 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. Véanse, v.g., U.S. Pat. Nos. 6.740.740 y 6.841.659 para exposición de ciertos métodos útiles para purificación de sustancias a partir de tejidos o fluidos de plantas.

Cuando es posible formular el producto junto con el material de planta, a menudo será deseable haber utilizado una planta que no sea tóxica para el receptor relevante (v.g., un humano u otro animal). El tejido de planta relevante (v.g. células, raíces, hojas) puede cosecharse simplemente y procesarse conforme a métodos conocidos en la técnica, con la consideración debida al mantenimiento de la actividad del producto expresado. En ciertas realizaciones de la invención, es deseable tener expresado el polinucleótido en una planta comestible (y, específicamente, en porciones comestibles de la planta) de tal modo 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 suministro oral (cuando se formula adecuadamente), puede ser deseable producir la proteína en una porción

comestible de la planta, y formular el polinucleótido expresado para suministro oral junto con parte o la totalidad del material de la planta con el que se expresó el polinucleótido.

5 Cuando el polinucleótido codifica o produce un agente terapéutico, el mismo puede formularse conforme a técnicas conocidas. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto farmacéuticamente activo puede formularse junto con uno o más materiales portadores orgánicos o inorgánicos, líquidos o sólidos, farmacéuticamente adecuados. Un producto farmacéuticamente activo producido conforme a la presente invención puede emplearse en formas de dosificación tales como tabletas, cápsulas, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, unguentos, aerosoles, paquetes de polvos, soluciones líquidas, disolventes, diluyentes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, y agentes de fijación sólidos, con tal que la actividad biológica de la proteína no se destruya por dicha forma de dosificación.

15 Materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin carácter limitante, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil-celulosa sódica, etil-celulosa y acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; talco, excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilen-glicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico, agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica, solución de Ringer; alcohol etílico, y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de desmoldeo, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, y agentes perfumantes, conservantes, y antioxidantes, todos los cuales pueden estar presentes también en la composición, con arreglo al criterio del formulador (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences, Edición Decimoquinta, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton PA, 1975). Por ejemplo, el producto de expresión del polinucleótido puede proporcionarse como una composición farmacéutica por medio de procesos convencionales de mezclado, granulación, fabricación de grageas, disolución, liofilización, o similares.

30 En ciertas realizaciones preferidas, puede ser deseable prolongar el efecto de una preparación farmacéutica por ralentización de la absorción del producto farmacéuticamente activo (v.g., proteína) que se inyecta por vía subcutánea o intramuscular. Esto puede realizarse por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo poco soluble en agua. La velocidad de absorción del producto depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño y la forma. Alternativamente, la absorción retardada de un producto administrado por vía parenteral se realiza por disolución o suspensión del producto en un vehículo oleoso. Formas de depósito inyectables se producen por formación de matrices de microcápsulas de la proteína en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la ratio de producto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Pueden prepararse formulaciones inyectables de tipo depósito por atrapamiento del producto en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos corporales.

45 Las preparaciones administradas por vía enteral de los productos farmacéuticamente activos pueden introducirse en forma sólida, semisólida, de suspensión o emulsión y pueden prepararse en forma de composiciones con cualesquiera portadores farmacéuticamente aceptables, tales como agua, agentes de suspensión, y agentes emulsionantes. Los productos de expresión pueden administrarse también por medio de bombas o formas de liberación sostenida, especialmente cuando se administran como medida preventiva, a fin de prevenir el desarrollo de una enfermedad en un individuo o mejorar o retardar una enfermedad ya establecida.

50 Los productos farmacéuticamente activos, opcionalmente junto con tejido de planta, son particularmente adecuados para administración oral como composiciones farmacéuticas. El material de plantas cosechado puede procesarse por cualquiera de una diversidad de vías (v.g. secado al aire, liofilización, extracción, etc.), dependiendo de las propiedades del producto terapéutico deseado y su forma deseada. En realizaciones preferidas, tales composiciones como se han descrito arriba se ingieren por vía oral solas o se digieren junto con alimento o pienso o una bebida. Las composiciones para administración oral incluyen plantas; extractos de plantas, y proteínas purificadas a partir de plantas infectadas proporcionadas como polvos secos, piensos, disolventes acuosos o no acuosos, suspensiones, o emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones agua-alcohol, emulsiones o suspensiones, con inclusión de vehículos parenterales intermedios salinos y tamponados, con inclusión de solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos. Ejemplos de polvos secos incluyen cualquier biomasa de plantas 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 comercial de aire a aproximadamente 120 grados Fahrenheit hasta que la biomasa contiene menos de 5% de humedad en peso. Las plantas secadas pueden guardarse para procesamiento ulterior como sólidos a granel o procesarse ulteriormente por trituración para dar un polvo del tamaño de malla deseado. Alternativamente, puede utilizarse liofilización para productos que son sensibles para el secado al aire. Los productos pueden liofilizarse poniéndolos en un secador de vacío y liofilización a vacío hasta que la biomasa

contiene menos de aproximadamente 5% de humedad en peso. El material secado puede procesarse ulteriormente como se describe en esta memoria.

5 El material derivado de plantas se puede administrar como o junto con una o más preparaciones herbales. Preparaciones herbales útiles incluyen preparaciones herbales líquidas y sólidas. Algunos ejemplos de preparaciones herbales incluyen tinturas, extractos (v.g., extractos acuosos, extractos alcohólicos), decocciones, preparaciones secas (v.g., secadas al aire, secadas por pulverización, congeladas, o liofilizadas), polvos (v.g., polvo liofilizado), y líquidos. Las preparaciones herbales pueden proporcionarse en cualquier vehículo de suministro estándar, tal como una cápsula, tableta, supositorio, dosificación líquida, etc. Los expertos en la técnica apreciarán las diversas formulaciones y modalidades de suministro de las preparaciones herbales que pueden aplicarse a la presente invención.

15 Los expertos en la técnica apreciarán también que un método particularmente preferido de obtención de los productos farmacéuticamente activos deseados es por extracción. El material de plantas (v.g., raíces, hojas, etc.) puede extraerse para separar los productos deseados de la biomasa residual, aumentando con ello la concentración y pureza del producto. Las plantas pueden extraerse también en una solución tamponada. Por ejemplo, el material de plantas puede transferirse a una cantidad de agua enfriada en hielo en una ratio de 1 a 1 en peso que ha sido tamponada con, v.g., tampón de fosfato. Pueden añadirse también en caso necesario inhibidores de proteasas. El material de plantas puede someterse a disgregación por mezcla o trituración enérgica mientras está suspendido en la solución tampón y la biomasa extraída puede separarse por filtración o centrifugación. El producto transportado en solución puede purificarse ulteriormente por pasos adicionales o convertirse en un polvo seco por liofilización o precipitación. La extracción puede llevarse a cabo también por compresión. Las plantas o raíces pueden extraerse también por compresión en una prensa o ser trituradas a medida que pasan a través de cilindros separados estrechamente. Los fluidos exprimidos a partir de las plantas o raíces trituradas se recogen y se procesan conforme a métodos bien conocidos en la técnica. La extracción por compresión 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 extrajera en solución.

30 Linajes de raíz, linajes de células, plantas, extractos, polvos, preparaciones secadas y proteínas purificadas o productos de ácido nucleico de inventiva, etc., pueden encontrarse también en forma encapsulada con o sin uno o más excipientes como se ha indicado arriba. Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y revestimientos tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos controladores de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de las formulaciones farmacéuticas. En tales formas de dosificación sólidas, el producto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación pueden comprender también, como ocurre en la práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, v.g., lubricantes para fabricación de tabletas y otros adyuvantes de fabricación de tabletas tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tampón. Aquéllas pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y puede tratarse también de una composición tal que las mismas liberen el o los ingredientes activos únicamente, o con preferencia, en cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones de imbibición que pueden utilizarse incluyen sustancias polímeras y ceras.

45 En otras realizaciones particularmente preferidas, una planta o porción de la misma que expresa un producto farmacéuticamente activo conforme a la presente invención, o biomasa de la misma, se administra por vía oral como alimento medicinal. Tales composiciones comestibles son consumidas comiéndolas crudas, si se encuentran en forma sólida, o bebiéndolas, si están en forma líquida. En una realización preferida, el material de planta se ingiere directamente sin un paso previo de procesamiento o después de preparación culinaria mínima. En una realización alternativa, la biomasa de plantas se procesa y el material recuperado después del paso de procesamiento se ingiere.

55 Métodos de procesamiento utilizados preferiblemente en la presente invención son métodos utilizados comúnmente en la industria de alimentos o piensos. Los productos finales de tales métodos incluyen todavía una cantidad sustancial del polinucleótido o polipéptido farmacéuticamente activo expresado y se comen o se beben de manera preferible convenientemente. El producto final puede mezclarse también con otras formas de alimentos o piensos, tales como sales, portadores, intensificadores de sabor, antibióticos, y análogos, y consumirse en forma sólida, semisólida, de suspensión, de emulsión, o líquida. En otra realización preferida, tales métodos incluyen un paso de conservación, tal como, v.g., pasteurización, cocinado, o adición de agentes de conservación y preservación. Cualquier planta de utiliza y se procesa en la presente invención para producir material de plantas comestible o bebible. La cantidad de producto de expresión polinucleotídico o polipeptídico farmacéuticamente activo en una preparación derivada de plantas puede ensayarse por métodos estándar en la técnica, v.g., electroforesis en gel, ELISA, o análisis por transferencia Western, utilizando una sonda o anticuerpo específico para el producto. Esta determinación puede utilizarse para estandarizar la cantidad de polinucleótido o proteína ingerida. Por ejemplo, la cantidad de producto terapéuticamente activo puede determinarse y regularse, por ejemplo, por mezcla de lotes de producto que tienen niveles diferentes de producto de tal modo que la cantidad de material a beber o comer para ingerir una sola dosis puede estar estandarizada.

Un polinucleótido o proteína farmacéuticamente activo producido en una célula o tejido de planta e ingerido por un hospedador es absorbido preferiblemente por el sistema digestivo. Una ventaja de la ingestión de tejido de planta que ha sido sólo mínimamente procesado es facilitar la encapsulación o secuestro del polinucleótido o proteína en las células de la planta. Así, el producto puede recibir al menos cierta protección contra la digestión en el tracto digestivo superior antes de alcanzar la tripa o intestino y podría estar disponible para absorción una mayor proporción de producto activo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse terapéutica o profilácticamente. En ciertas realizaciones preferidas, las composiciones se pueden utilizar para tratar o prevenir una enfermedad. Por ejemplo, puede tratarse cualquier individuo que sufre una enfermedad o que se halla en riesgo de desarrollar una enfermedad. Se apreciará que un individuo puede considerarse en riesgo para desarrollar una enfermedad sin haber sido diagnosticado por presentar cualesquiera síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, si el individuo tiene un marcador genético particular identificado como asociado con riesgo incrementado de desarrollar una enfermedad particular, dicho individuo se considerará en riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Análogamente, si los miembros de una familia de individuos han sido diagnosticados con una enfermedad particular, v.g., cáncer, el individuo puede ser considerado como en riesgo de desarrollar dicha enfermedad.

Formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero sin carácter limitante, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados 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, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspendedores, agentes edulcorantes, suavizantes y perfumantes.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar por mezcla de las composiciones de esta invención con excipientes adecuados no irritantes o portadores tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorios que son sólidos a las temperaturas del ambiente pero líquidos a la temperatura del cuerpo y por consiguiente se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan la proteína activa.

Formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de esta invención incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalaciones o parches. El producto activo, o la preparación del mismo, se mezclan en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualesquiera conservantes o tampones necesarios que puedan requerirse. Se contemplan también como dentro del alcance de esta invención formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos, y gotas para los ojos. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar suministro controlado de una proteína farmacéuticamente activa al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden producirse por suspensión o dispensación de producto farmacéuticamente activo en el medio apropiado. Pueden utilizarse también intensificadores de la absorción para aumentar el flujo de la proteína farmacéuticamente activa a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana controladora de la velocidad o por dispersión de la proteína farmacéuticamente activa en una matriz de polímero o gel.

Las composiciones se administran en tales cantidades y durante tanto tiempo como sea necesario para alcanzar el resultado deseado. Como se ha descrito arriba, en ciertas realizaciones de la presente invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición farmacéutica es aquella cantidad eficaz para tratar, atenuar, o prevenir una enfermedad en un hospedador. Así, la "cantidad eficaz para tratar, atenuar, o prevenir una enfermedad", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición farmacéutica para tratar, atenuar, o prevenir la enfermedad en cualquier hospedador. Sólo a título de ejemplo, la "cantidad terapéuticamente eficaz" puede ser una cantidad para tratar, atenuar, o prevenir diabetes, deficiencia de hormona del crecimiento, etc. Como otro ejemplo, la "cantidad terapéuticamente eficaz" puede ser una cantidad suficiente para causar una respuesta inmune en un individuo, v.g., la producción de anticuerpos que se fijan a un antígeno particular. Preferiblemente, los anticuerpos protegen contra o reducen la gravedad de infección o protegen contra una enfermedad o condición que puede ser resultado de la exposición al antígeno.

La cantidad exacta requerida variará de un individuo a otro, dependiendo de la especie, edad, y condición general del individuo, la fase de la enfermedad, la mezcla farmacéutica particular, su modo de administración, y análogos. Las plantas infectadas de la invención y/o preparaciones de proteínas de aquéllas se formulan preferiblemente en forma de dosis unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una unidad físicamente discreta de producto de expresión del polinucleótido o polipéptido farmacéuticamente activo apropiado para el paciente a tratar. No obstante,

se comprenderá que el uso total diario de las composiciones de la presente invención será decidido preferiblemente por un médico encargado del caso dentro del alcance de un criterio médico sólido. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente u organismo particular puede depender de diversos factores que incluyen el trastorno de que se trate y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo del paciente, dieta del paciente, condición farmacocinética del paciente, tiempo de administración, ruta de administración, y tasa de excreción del compuesto respectivo empleado; la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores análogos bien conocidos en las técnicas médicas.

Se apreciará también que las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación, es decir, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar simultáneamente con, antes de, o subsiguientemente a, uno o más otros agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticas o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. Se apreciará también que las terapias empleadas pueden alcanzar un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de inventiva puede administrarse simultáneamente con otro agente anti-cáncer), o pueden alcanzar efectos diferentes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de Vectores Recombinantes de Virus de Plantas

Se emplearon vectores basados en el Virus del Mosaico del Tabaco que están adaptados para inserción de un polinucleótido de interés a fin de crear un vector para uso en la generación de linajes de raíz clonal, linajes de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, y/o plantas clonales que expresan un polinucleótido de interés conforme a la presente invención. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de un vector basado en TMV, D4, que se manipuló genéticamente para aceptar la inserción de un polinucleótido de interés (Shivprasad et al., Virology, 255 (2): 312-23, 1999), e ilustra la inserción de diversos polinucleótidos de interés en el vector. D4 contiene una deleción de las secuencias codificantes de la proteína de la cubierta (CP) de TMV, pero retiene el promotor subgenómico de CP de TMV y la región no traducida (UTR) 3' de TMV, como se indica en la figura. Las proteínas de 126 y 183 kD son necesarias para la replicación de TMV. La proteína de 30 kD es la proteína de movimiento (MP), utilizada para el movimiento célula-a-célula. D4 contiene sitios *PacI* y *XhoI* aguas abajo del promotor subgenómico de CP, proporcionando un sitio para inserción conveniente de un polinucleótido de interés. Vectores particulares creados por inserción de diversos polinucleótidos de interés en D4 se describen más adelante.

D4C3GFP es un vector de expresión basado en TMV que es deficiente en producción de CP (Shivprasad et al., 1999: TTT-GFP) como resultado de la deleción de la región codificante de CP de TMV y su reemplazamiento con el gen C3GFP, que está bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV. El gen C3GFP se clonó de nuevo en D4 por solapamiento PCR para eliminar los sitios *NcoI* y *XhoI* en la secuencia de nucleótidos de GFP C3 a fin de facilitar pasos de clonación ulteriores. Se introdujo un polienlazador *PstI-NotI-XhoI* en el extremo 3' del gen C3GFP. El producto PCR digerido con *PacI-XhoI* se clonó en D4 dando como resultado D4C3GFP.

Los cebadores utilizados por los inventores para modificar el gen C3GFP y eliminar los sitios *NcoI* y *XhoI* son:

1) C3GFP.PacI.Dir(N)	
GGGAG.ATCTT.AATTA.ATGGC.TAGCA.AAGGA.GAAGA.A	36nt
2) C3GFP.XhoI.Inv(N)	
CCCCT.CGAGC.GGCCG.CTGCA.GTTAT.TTGTA.GAGCT.CATCC.ATGCC	45nt
3) C3GFP.NcoI.Dir	
GTTCC.CTGGC.CAACA.CTTGT.CAC	23nt
4) C3GFP.NcoI.Inv	
TAGTG.ACAAG.TGTTG.GCCAG.GG	22nt
5) C3GFP.XhoI.Dir	
GGACA.CAAAC.TGGAG.TACAA.CTATA	25nt
6) C3GFP.XhoI.Inv	
AGTTA.TAGTT.GTACT.CCAGT.TTGTG	25nt
7) (BglIII)-PacI	

>AUG...HindIII...NcoI...NdeI...BsrGI...MluI...XhoI...BamHI...MfeI(MunI)...SalI
 ...SacI...TAA< PstI...NotI...XhoI

Se generaron también 3 constructos que contenían la longitud total o porciones de la región no traducida 3' (3'-UTR) de RNA3 de AIMV. En cada uno de estos constructos, estaban presentes secuencias que codificaban C3GFP bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV, aguas arriba de secuencias 3'-UTR de RNA3 de AIMV (la longitud total o una porción de la UTR), que permitieron a los inventores identificar con precisión las secuencias de la UTR 3' de RNA3 de AIMV requerida para ensamblaje y movimiento del RNA genómico de TMV (en posición *trans* o *cis*). Las secuencias de RNA3 se insertaron entre los sitios *NotI* y *XhoI* del nuevo vector D4C3GFP como fragmentos *NotI-SalI*, dando como resultado los constructos SR25 (nts1859-1941 de RNA3), SR26 (nts1859-1969 de RNA3) y SR27 (nts. 1859-2037 de RNA3, es decir, la UTR 3' entera) (Figura 11d). Además de secuencias de la UTR 3' de RNA3 de AIMV, SR25, SR26, y SR27 incluyen también secuencias de la UTR 3' de TMV (a saber, la UTR del transcrito genómico de TMV) aguas abajo de las secuencias de AIMV insertadas. Estas secuencias son los nucleótidos de TMV 6192-6395, como en el constructo D4. Los virus basados en TMV (SR25, SR26, y SR27) son deficientes en movimiento a larga distancia debido a que la proteína de la cubierta de TMV es esencial para el transporte eficaz a larga distancia mediado por el floema y la infección sistémica de TMV.

Los cebadores utilizados para generar constructos basados en D4 con secuencias 3'-UTR de RNA3 de AIMV fueron:

- 1) cebador 5' SR-52 con sitios *XhoI-PstI* en nt 1859 (sentido más) 5'-CCGCTCGAGCTGCAGTGTACCCCATTAATTTGG-3'
- 2) cebador 3' SR-53 en nt 1941 de RNA3 de AIMV con sitios 3'*NotI-SalI*: sentido menos 5'-CGGGTTCGACGCGGCCGCAATAGGACTTCATACCT-3'
- 3) cebador 3' SR-54 con sitios *NotI-SalI* en nt 1969 de RNA3 de AIMV: sentido menos 5'-CGGGTTCGACGCGGCCGCAATATGAAGTCGATCCTA-3'
- 4) cebador 3' SR-55 con sitios *NotI-SalI* en nt 2037 (sentido menos) 5'-CGGGTTCGACGCGGCCGCGCATCCCTTAGGGGCATT-3'.

Los vectores virales en los que se insertan los polinucleótidos de interés (v.g., GFP-hGH, GCSF) en SR25, SR26, y/o SR27 se encuentran en el proceso de ser ensayados para generación de linajes de raíz clonal, linajes de células de plantas clonales, y plantas clonales como se describe en esta memoria.

Para generar constructos basados en TMV adecuados para expresión de la hormona del crecimiento humana (hGH), los inventores insertaron el gen para hGH en el vector D4 entre los sitios *PacI* y *XhoI*. Se introdujo un AUG en el cebador 5' utilizado para amplificar el gen a partir de un plásmido, y se introdujeron los aminoácidos KDEL en el extremo 3' de la secuencia codificante a fin de mejorar la traducción debida a la retención en el ER. Para los experimentos descritos en esta memoria, se clonó hGH sin su secuencia conductora nativa, dando como resultado D4-hGH, que se utilizó en los experimentos descritos en esta memoria.

Se utilizó el cebador SR22 (5'-CCG **TTAATTAATG** TTC CCA ACT ATT CCA) para clonar hGH sin su conductor, e introduciendo un sitio *PacI* en el extremo 5'; se utilizó el cebador SR23 (5'-CCG **TTAATTAATG** GCA ACT GGA TCA AGG) para clonar hGH con su conductor. Se utilizó el cebador SR24 (5'-CGG **CTC GAG** TTA AAA ACC ACA TGA) para clonar el gen hGH sin KDEL e introduciendo un sitio *XhoI* en el extremo 3'; y se utilizó el cebador SR25 (5'-CGG **CTC GAG** TTC ATC TTT AAA ACC TGA TCC) para clonar el gen con KDEL.

Para generar constructos basados en TMV adecuados para expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos humanas (GCSF), se sintetizó en primer lugar el marco de lectura abierto (ORF) entero codificante de GCSF sin el péptido señal. La secuencia del gen sintetizado se optimizó para expresión en plantas. El ORF se sintetizó con sitios *PacI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. El gen se escindió por digestión con *PacI* y *XhoI* y se ligó en el vector D4, que se linealizó utilizando *PacI* y *XhoI*. El vector resultante (D4-GCSF) se utilizó para los experimentos descritos en esta memoria.

Ejemplo 2: Generación y Ensayo de Linajes de Raíz Clonal que Expresan GFP

Materiales y Métodos

Síntesis de transcritos virales e infección viral. Se sintetizaron transcritos *in vitro* del vector D4C3GFP, arriba descrito, que contiene un marco de lectura abierto que codifica GFP bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV, utilizando polimerasa T7. Se linealizaron aproximadamente 10 µg de DNA con 30 unidades de *KpnI* durante una noche en un volumen de reacción de 100 µL. Se utilizaron 4 µL del material digerido por restricción para producir transcritos *in vitro* utilizando el Kit AmpliCap T7 High Yield Message Maker (Epicentre) conforme a las recomendaciones de los fabricantes. Los transcritos de una reacción de este tipo se utilizaron para infectar plantas de *Nicotiana benthamiana* de 6 semanas de edad por aplicación manual de los transcritos disueltos en FES sobre hojas jóvenes totalmente expandidas.

Agrobacterium rhizogenes estimulaba la generación de raíz. Se cultivó la cepa A4RSII de *Agrobacterium rhizogenes* hasta DO₆₀₀ 0,8-1. Las células bacterianas se peletizaron y resuspendieron en medio MS-2 (sales MS, sacarosa al 2%, MES 10 mM, pH 5,5) hasta una DO₆₀₀ final de 0,5. Se añadió acetosiringona hasta una concentración final de 200 µM 1 hora antes de la transformación. Las hojas de *Nicotiana benthamiana* local o sistémicamente infectadas se cosecharon 5-14 días después de la inoculación con el transcrito. Las hojas se esterilizaron superficialmente durante 6 minutos con Clorox al 10% y se lavaron varias veces con agua destilada estéril.

Las hojas de *N. benthamiana* esterilizadas superficialmente se cortaron en piezas de ~ 1 cm². Se sumergieron éstas en suspensión bacteriana durante 5 min, se escurrieron sobre papel de filtro y se pusieron sobre la superficie de medio MS-2 solidificado. Las placas se guardaron en condiciones de luz tenue a 24°C durante 48 horas. Después de 48 horas, se eliminó el exceso de suspensión de *Agrobacterias*, y se pusieron explantes de hojas sobre medio K₃ sólido exento de hormonas (Kao K.N. y Michayluk M.R., *Plants*, 115:355-367, 1974.) modificado de acuerdo con Nagy y Maliga, (Nagy J.J. y Maliga P., *Z.Pflanzenphysiol.* 78:453-455, 1976) y Menczel *et al.* (Menczel L., Nagy F., Kiss L.R. y Maliga P., *Theor. Appl. Genet.* 59:191-195, 1981). Las placas se mantuvieron a 25°C con un régimen de luz de 16 horas día/8 horas noche.

Tres semanas después de la transformación, se cortaron las raíces pilosas y se alinearon en medio K₃ sólido exento de hormonas. Cuatro a seis días después, las raíces que crecían más activamente se aislaron y se transfirieron a medio K₃ líquido en cápsulas Petri individuales. Las raíces se cultivaron en una máquina de sacudidas rotativa a 24°C y se subcultivaron ~ semanalmente por disección y recolección de una porción de la masa de raíces y transferencia de las raíces cosechadas a una cápsula Petri que contenía medio K₃ fresco. Las raíces se cribaron respecto a la presencia de la proteína de interés por análisis de transferencia Western y/o por fluorescencia bajo luz UV, dependiendo del polinucleótido particular de interés.

Ensayos de Transferencia Western: Para los ensayos de transferencia Western, se pusieron 10 mg de material de raíces fresco en un tubo Eppendorf y se homogeneizaron en 50 µL de tampón de fosfato, seguido por la adición de 20 µL de tampón de carga 5x y 10 minutos de ebullición. Después de la ebullición, el homogeneizado se centrifugó durante 5 a 10 minutos para aclarar los residuos. Después de centrifugación, se cargaron 10 µL de muestra en un gel de SDS-poliacrilamida, y se separaron las proteínas por electroforesis. Se cargó proteína GFP disponible comercialmente (5 ng) (BD Biosciences Clontech) como control positivo. Las muestras de hoja (10 mg) de plantas *N. benthamiana* infectadas sistémicamente con el mismo vector (D4C3GFP) se cosecharon en el momento de máxima expresión, y se preparó un extracto de manera idéntica a la arriba descrita para el material de raíces y se cargó en el gel para comparación con los linajes de células de raíz. Una vez completada la electroforesis, las proteínas se pasaron por electrotransferencia a una membrana de nailon, se bloquearon utilizando caseína y se dejaron reaccionar con anticuerpos específicos de GFP (BD Biosciences Clontech). Las proteínas que reaccionaban con los anticuerpos se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente.

Resultados

Las Figuras 6A-6E muestran el método global utilizado para generar los linajes de raíz clonal (véase Descripción). La Figura 6G muestra una fotografía de un linaje de raíz clonal que expresaba GFP que se obtuvo por infección de *N. benthamiana* con el vector viral D4C3GFP, cosecha de tejido de hoja de la región infectada, infección con *A. rhizogenes*, y cultivo de las piezas para permitir el desarrollo de raíces pilosas, que se aislaron luego y se cultivaron ulteriormente.

Las Figuras 7A-7C muestran análisis por transferencia Western que demostraban la producción de GFP en 3 linajes de raíz clonal derivados de células de plantas en las cuales se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GFP bajo control del promotor CP de TMV (D4C3GFP). La Figura 7A muestra la expresión de GFP en los linajes de raíz clonal después de 30 días de propagación en cultivo (es decir, 30 días después de la separación de la raíz de las hojas de las que se derivaba). La Figura 7B muestra la expresión de GFP en los linajes de raíz clonal después de 60 días de propagación en cultivo (es decir, 60 días después de la separación de la raíz de la hoja de la que se derivaba). C- representa pistas de control que no contienen proteína alguna. MWM representa marcadores de peso molecular. GFP-R representa muestras de linajes de raíz clonal, GFP-P representa GFP aislada de tejido de hoja de una planta infectada con el mismo constructo utilizado para generación de los linajes de raíz clonal. La Figura 7C es un control que muestra que los anticuerpos anti-GFP reconocen la proteína GFP disponible comercialmente. Estos resultados demuestran que los linajes de raíz clonal mantienen alto nivel de expresión de una proteína de interés (GFP) a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, indicando la estabilidad del transcrito viral en los linajes de raíz clonal.

Las Figuras 8A y 8B muestran fotografías de linajes de raíz clonal productores de hGH (véase el Ejemplo 4) o GFP. La Figura 8A muestra una fotografía de dos linajes de raíz clonal tomada en condiciones de luz normal. La placa de la izquierda muestra un linaje de raíz clonal derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH) bajo control del promotor de CP de TMV. La placa de la derecha muestra un linaje de raíz clonal derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) bajo

control del promotor CP de TMV. La Figura 8B muestra una fotografía de los mismos linajes de raíz clonal que se muestran en la Figura 8A, tomada bajo luz UV, demostrando la expresión de GFP. Estos resultados demuestran una expresión robusta de GFP en la masa de raíces, e ilustran la conveniencia del cribado basado en fluorescencia para la expresión de un polinucleótido de interés.

Debe indicarse que el análisis Western demostró la expresión de GFP en todas las porciones de la masa de raíces. Sin embargo, cuando se cribó utilizando un método visual, la expresión aparece generalmente más fuerte en las porciones más maduras de la masa de raíces que en las puntas de crecimiento, donde la división celular está progresando rápidamente. Esto parece ser debido tanto al tiempo requerido para que las células nuevas sintetizen suficiente GFP para visibilidad como al hecho de que, cuando se observa desde arriba, se está observando a través de capas múltiples de células en la porción más gruesa de las raíces. Debe indicarse también que las porciones más maduras de las raíces pueden llegar a resultar un tanto "leñosas", lo que puede oscurecer la detección visual de GFP.

15 **Ejemplo 3: Generación y ensayos de linajes de raíz clonal que expresan hGH**

Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con un vector basado en TMV, D4-hGH, que contiene un marco de lectura abierto que codifica hGH bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV. Se obtuvieron raíces pilosas y se subcultivaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Dos semanas después de la separación de los discos de hoja, durante la tercera tanda de subcultivo, los segmentos de raíces se analizaron respecto a la expresión de hGH por el ensayo de transferencia Western (Figura 9) y esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Se utilizaron 5 ng de proteína hGH (Research Diagnostics) como control en todas las transferencias Western en las cuales se ensayó la expresión de hGH. Los anticuerpos anti- hGH eran de Research Diagnostics. Como puede verse por la Figura 9, hasta 80% de los linajes de raíz clonal tenían niveles detectables de hGH. Se seleccionaron los productores más fuertes y se propagaron los mismos ulteriormente. Después de 30 pases (subcultivos), se tomaron muestras y se realizaron respecto a la acumulación de hGH. La Figura 10 muestra una transferencia Western, que demuestra que los linajes de raíz clonal mantenían expresión estable de hGH después de 10 pases en los cuales la expresión de hGH en linajes seleccionados era varias veces mayor (250 µg/gramo de tejido de raíz fresco) que en las hojas infectadas con el mismo constructo viral (70 µg/gramo de tejido de hoja fresca) cuando se comparaban por transferencia Western.

Las Figuras 8A y 8B muestran fotografías de linajes de raíz clonal productores de hGH y GFP. La Figura 8A muestra una fotografía de dos linajes de raíz clonal tomada en condiciones de luz normal. La placa de la izquierda muestra un linaje de raíz clonal derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la hormona del crecimiento humana (hGH) bajo control del promotor CP de TMV. La placa de la derecha muestra un linaje de raíz clonal derivado de una célula de planta en la cual se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) bajo control del promotor CP de TMV. La Figura 8B muestra una fotografía de los mismos linajes de raíz clonal que se muestran en la Figura 8A tomada bajo luz UV, demostrando la expresión de GFP.

40 **Ejemplo 4: Generación y ensayos de linajes de raíz clonal que expresan GCSF**

Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con un vector basado en TMV, D4-GCSF, que contiene un marco de lectura abierto que codifica GCSF bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV, y se obtuvieron raíces pilosas esencialmente como se describe en el Ejemplo 2. Dos semanas después de la separación de los discos de hoja, se analizaron los segmentos de raíces respecto a la expresión de GCSF por el ensayo de transferencia Western (Figura 11). Como puede verse por la Figura 11, hasta 80% de los linajes de raíz clonal tenían niveles detectables de GCSF. Se seleccionaron los productores más fuertes y se propagaron ulteriormente los mismos. Después de 10 pases (en los cuales se cosecharon porciones de la masa de raíces y se transfirieron a cápsulas Petri nuevas que contenían medio fresco), se tomaron muestras y se analizaron respecto a la acumulación de GCSF. La Figura 12 muestra una transferencia Western, demostrando que los linajes de raíz clonal mantenían expresión estable de GCSF después de 10 pases (subcultivos). Se utilizaron 5 ng de GCSF recombinante producido utilizando un sistema de expresión de *E coli* como control en todos los ensayos Western en los cuales se ensayó la expresión de GCSF. Los anticuerpos anti-GCSF eran de Oncogene Science.

55 **Ejemplo 5: Generación y ensayos de linajes de células de plantas clonales que expresaban GCSF**

Cultivo de células y electroporación. Linajes de células derivados de *Nicotiana tabacum* cv Bright yellow (BY-2) se mantuvieron en medio MS (Murashige T. y Skoog F., *Physiol. Plant.* 15:473-497, 1962) suplementado con 0,2 mg/12,4-D y 0,1 mg/l de Cinetina, MES 20 mM, pH 5,6-5,8 en una máquina de sacudidas, 140 rpm a 25°C, y se subcultivaron semanalmente. Para la electroporación, se generaron protoplastos a partir de células que se habían subcultivado durante 3-4 días. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 8 min, se lavaron 2 veces con manitol 0,4 M y MES 20 mM, de pH 5,5. Las células se llevaron luego a 30-50 ml con solución de protoplastos esterilizada por filtración: manitol 0,4 M, MES 20 mM, pH 5,5, Cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha Co.) 1%, Pectolyasa Y23 (Seishin Pharmaceutical Co.) 0,1%. Las células se incubaron en matraces de 250 ml a 25°C durante 20-25 min. La solución de protoplastos se filtró a través de un tamiz de 100µm, se centrifugó a 700 rpm durante 6

min, y se lavó dos veces con manitol 0,4 M enfriado en hielo. Los protoplastos se contaron utilizando un hemacitómetro y se resuspendieron en tampón de electroporación: HEPES 10 mM, NaCl 15 mM, CaCl₂ 5 mM, manitol 0,4 M, pH 7,2 hasta una concentración final de 1×10^6 protoplastos/ml.

5 El transcrito (25-30 μ L) se puso en una cubeta de electroporación, de 0,4 cm (Biorad) mantenida en hielo, y después de 10-15 min se mezcló con 0,5 ml de suspensión de protoplastos con una pipeta Pasteur y se utilizó inmediatamente para la electroporación de las células. La electroporación se realizó utilizando un Biorad Gene Pulser a 250 voltios y capacitancia 175. Los protoplastos sometidos a electroporación se resuspendieron en 8 ml de tampón PBS que contenía manitol 0,4 M y se mantuvieron para la formación de la pared celular.

10 *Enriquecimiento en linajes de células productoras estables.* Dentro de 4-5 días después de la electroporación, las células en división se diluyeron y se muestrearon (10 μ L de células infectadas en 100 μ L de medio) para enriquecimiento de células que expresaban el polinucleótido de interés (molécula diana) a niveles altos. Las células diluidas se extendieron por puntos en secciones individuales de una cápsula Petri, como se muestra en la Figura 13E. Dos a tres semanas más tarde, cada muestra se ensayó por medios visuales o de otro tipo (v.g., transferencia Western) respecto a la presencia de molécula diana (v.g., GFP, GCSF, hGH, etc.). Las células infectadas de manera estable que producían la molécula diana se seleccionaron para enriquecimiento ulterior hasta obtener el linaje de células productoras.

20 **Resultados**

Se derivaron linajes de células clonales por introducción de un vector viral basado en TMV que contenía un marco de lectura abierto que codifica GCSF bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV en células BY-2. El proceso global se muestra en la Figura 13. El enriquecimiento en células que expresan GCSF se realizó utilizando ensayos de transferencia Western hasta que se obtuvieron poblaciones de células (linajes de células clonales simples o poblaciones que contenían varios linajes de células clonales). La *Figura 14* muestra análisis por transferencia Western que demuestran la producción de GCSF en una población de células de plantas derivada de células de plantas en las cuales se introdujo un vector viral cuyo genoma contiene un gen que codifica GCSF bajo control del promotor CP de TMV. Debe indicarse que la población de células de plantas enriquecidas puede contener un solo linaje de células clonales o linajes múltiples. El enriquecimiento ulterior, utilizando muestras más diluidas, podría dar como resultado linajes de células clonales. La *Figura 14A* muestra una transferencia Western realizada 48 horas después de la introducción del vector. La *Figura 14B* muestra una transferencia Western realizada utilizando las mismas poblaciones de células que se muestran en la *Figura 14A* realizada después de mantenimiento ulterior de las células en cultivo, a saber, 57 días después de la inoculación. GCSF-COM indica una pista en la cual se cargó proteína GCSF recombinante como control positivo. MWM indica marcadores de peso molecular. C- indica una pista en la cual se cargó un extracto de plantas producido a partir de plantas que no expresaban GCSF.

40 ***Ejemplo 6: Generación y ensayos de linajes de células clonales que expresan GFP***

Resultados

Se derivaron linajes de células clonales por introducción de un vector viral basado en TMV que contenía un marco de lectura abierto que codifica GFP bajo control del promotor subgenómico de CP de TMV (D4C3GFP) en células BY-2 esencialmente como se describe en el Ejemplo 5. El enriquecimiento en células que expresan GFP se realizó utilizando un cribado visual respecto a fluorescencia hasta que se obtuvieron poblaciones de células (linajes de células clonales simples o poblaciones que contenían varios linajes de células clonales) que expresan de manera estable GFP. La *Figura 13C* muestra una suspensión de protoplastos que contiene células en las cuales se introdujo el vector viral. La *Figura 13E* presenta muestras diluidas a partir de la suspensión extendida en placas en gotitas individuales sobre cápsulas Petri. La *Figura 13F* muestra las mismas cápsulas Petri de la *Figura 13E* bajo luz UV. Se observan fácilmente los linajes de células clonales que expresan GFP. Debe indicarse que las gotitas pueden contener un solo linaje de células de plantas clonales o linajes múltiples de células de plantas clonales. Los linajes de células de plantas clonales simples (es decir poblaciones derivadas de una sola célula ancestral) pueden generarse por dilución limitante ulterior utilizando métodos estándar para clonación de células simples.

55 La *Figura 15* muestra la producción de GFP en linajes de células de plantas derivados de células de plantas en las cuales D4C3GFP. La *Figura 15A* muestra enriquecimiento para linajes de células de plantas que expresan GFP. La *Figura 15B* muestra un callo obtenido a partir de un linaje de células de plantas clonales que contiene un vector viral similar que no codifica GFP. Las fotografías se tomaron 3 meses después de la introducción del vector en las células a partir de las cuales se derivaron los clones de la *Figura 15A*. Ambas fotografías se tomaron bajo luz UV.

60 ***Ejemplo 7: Generación y ensayos de una planta clonal***

Se obtuvieron linajes de raíces clonales que expresaban hGH, como se describe en el Ejemplo 3. Las células de raíz se aislaron por digestión enzimática y se cultivaron como se describe en Peres et al., *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 65, 37-44, 2001, para generar plantas clonales. La *Figura 16A* muestra una planta que se obtuvo a partir de

5 un linaje de raíz clonal. Para determinar si la planta contenía el vector viral, se utilizó una pequeña muestra de hoja para inocular una variedad de tabaco que es un hospedador sensible para la formación de lesiones locales después de infección viral. La formación de lesiones dentro de dos días de la inoculación, como se indica por las flechas en la *Figura 16B*, indicaba que la plantas clonales regenerada a partir del linaje de raíz clonal mantiene replicación viral activa, sugiriendo fuertemente que la plantas clonales expresa también hGH. Experimentos adicionales demostraron que este era de hecho el caso (datos no presentados).

REIVINDICACIONES

1. Un linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o plantas clonales derivado(a) de una planta o porción de la misma, en donde una célula del linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o plantas clonales comprende de manera estable:
- 5 (i) un vector de RNA viral autorreplicante, episómico y extracromosómico que comprende un polinucleótido de interés que no está asociado normalmente con las secuencias del vector viral; y
- (ii) un DNA de Ri o porción del mismo suficiente para generar raíces pilosas; en donde las células del linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o plantas clonales se originan a partir de
- 10 una célula que se infectó con el vector de RNA viral antes de la introducción del T-DNA de Ri o porción del mismo, y en donde el linaje de raíz clonal, el linaje de células de raíz clonal, el linaje de células de plantas clonales, o la plantas clonales expresa el polinucleótido de interés.
2. El linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o la plantas clonales de la reivindicación 1, en donde el vector viral se deriva de TMV o AIMV.
3. El linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o la plantas clonales de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido de interés está enlazado operativamente a un promotor CP, un promotor MP, un promotor inducible, o un promotor activable en *trans*.
- 20 4. Un método de obtención de un linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o plantas clonales que expresa un polinucleótido de interés, que comprende pasos de:
- (i) introducción de un vector de RNA viral autorreplicante, episómico y extracromosómico que comprende el polinucleótido de interés en una planta o porción de la misma, en donde el polinucleótido de interés no está asociado
- 25 naturalmente con las secuencias del vector viral; y subsiguientemente
- (ii) introducción en la planta o porción de la misma de un DNA de Ri o porción del mismo suficiente para generar raíces pilosas, generando así uno o más linajes de raíz clonal, linajes de células de raíz clonal, linajes de células de plantas clonales, o plantas clonales a partir de la planta o porción de la misma; y
- (iii) cribado de uno o más de los linajes de raíz clonal, linajes de células de raíz clonal, linajes de células de plantas clonales, o plantas clonales para expresión del polinucleótido de interés; y
- 30 (iv) selección de un linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o plantas clonales que exhibe expresión del polinucleótido de interés, en donde una célula del linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, linaje de células de plantas clonales, o la plantas clonales seleccionado(a) comprende de manera estable el vector de RNA viral auto-replicante, episómico y extracromosómico y el T-DNA de Ri.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en donde el paso (ii) comprende poner en contacto la planta o porción de la misma con *Agrobacterium rhizogenes*.
6. El método de la reivindicación 4, en donde el vector viral se deriva de TMV o AIMV.
7. El método de la reivindicación 4, en donde el vector viral carece de secuencias codificantes de una proteína de la cubierta funcional, proteína de movimiento funcional, o ambas.
8. El método de la reivindicación 4, en donde el polinucleótido de interés está enlazado operativamente a un promotor CP, un promotor MP o un promotor inducible.
- 45 9. El método de la reivindicación 4, en donde el vector viral comprende un polinucleótido que codifica un marcador detectable o seleccionable.
- 50 10. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente el paso de mantener la planta o porción de la misma que contiene el vector viral durante un periodo de tiempo después de la introducción del vector viral y antes de la introducción del T-DNA de Ri para permitir la replicación del vector viral.
- 55 11. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente pasos de: liberación de células individuales a partir de una raíz clonal generada en el paso (ii); y mantenimiento de las células liberadas en cultivo en condiciones apropiadas para la proliferación de células de plantas.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en donde la proliferación de células de plantas es proliferación de células de raíz.
13. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente pasos de: liberación de células individuales a partir de una raíz clonal generada en el paso (ii); y
- 65 mantenimiento de las células liberadas en condiciones apropiadas para la formación de una planta.

14. Un método de producción de un polinucleótido o polipéptido, que comprende pasos de:
- 5 i) mantenimiento de un linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, o linaje de células de plantas clonales obtenido utilizando el método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12 en cultivo, o crecimiento de una plata clonal obtenida utilizando el método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 y 13;
 - (ii) cosecha de las células o medio de cultivo del linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, o linaje de células de plantas clonales, o cosecha del tejido de la planta clonal; y
 - (iii) aislamiento o purificación del polinucleótido o polipéptido a partir de las células, medio de cultivo, o tejido cosechados.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde el linaje de raíz clonal, linaje de células de raíz clonal, o linaje de células de plantas clonales es un linaje de raíz clonal.
16. El método de la reivindicación 14, que comprende:
- 15 mantenimiento en cultivo del linaje de raíz clonal;
 - cosecha del tejido de raíz o medio de cultivo del linaje de raíz clonal; y aislamiento o purificación del polipéptido de interés a partir del tejido de raíz o medio de cultivo cosechado.
17. El método de la reivindicación 14, que comprende:
- 20 mantenimiento en cultivo del linaje de células de raíz clonal o linaje de células de planta clonal;
 - cosecha de las células o medio de cultivo a partir del linaje de raíz clonal o linaje de planta clonal; y
 - aislamiento o purificación del polipéptido de interés a partir de las células de raíz cosechadas o medio de cultivo.
18. El método de la reivindicación 14, que comprende:
- 25 crecimiento de la planta clonal;
 - cosecha del tejido de planta a partir de la planta clonal; y
 - aislamiento o purificación del polipéptido de interés a partir del tejido de planta cosechado.

Figura 1

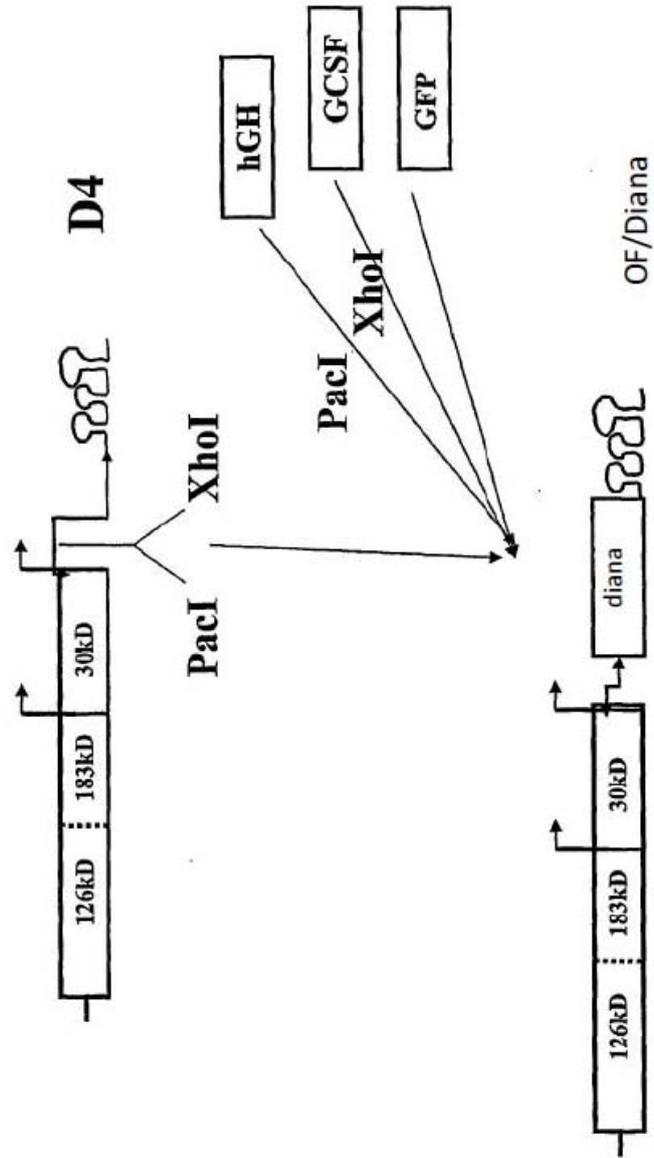


Figura 2

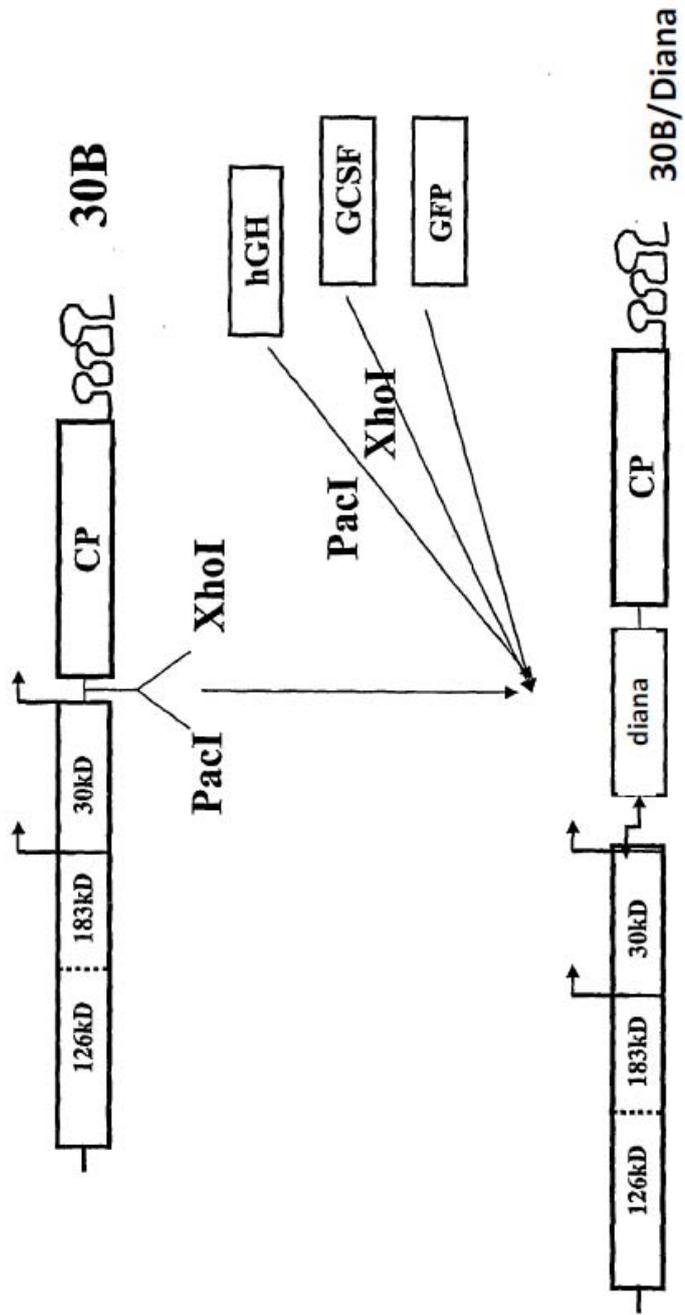


Figura 3

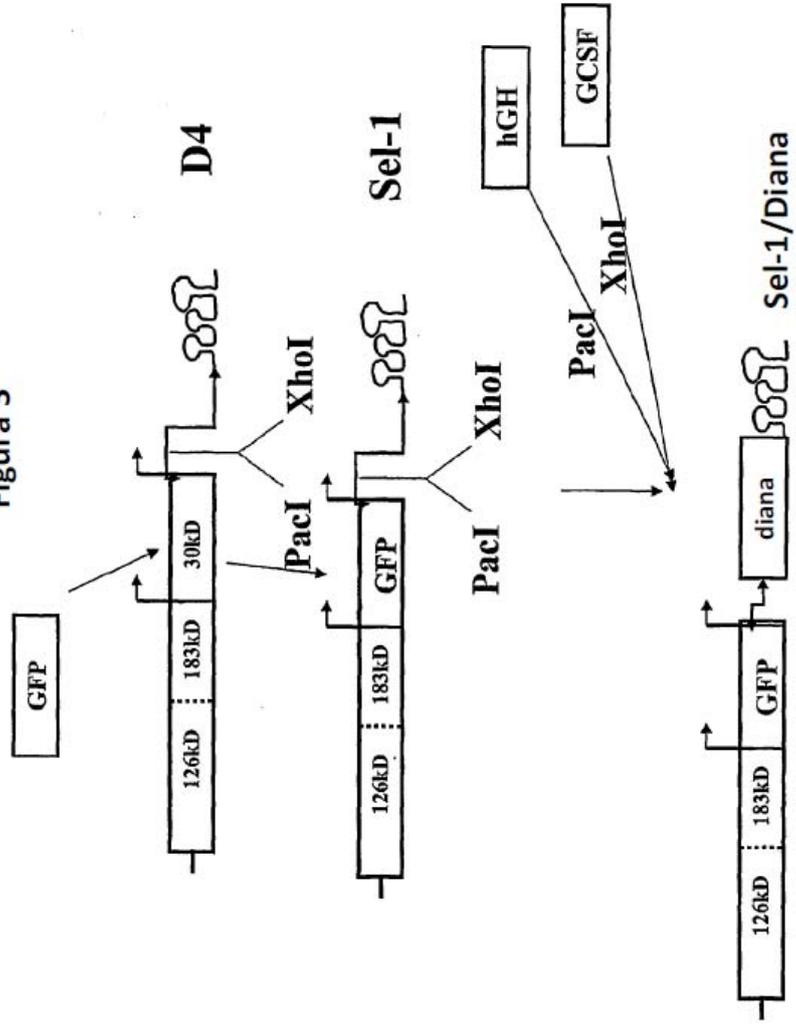


Figura 4

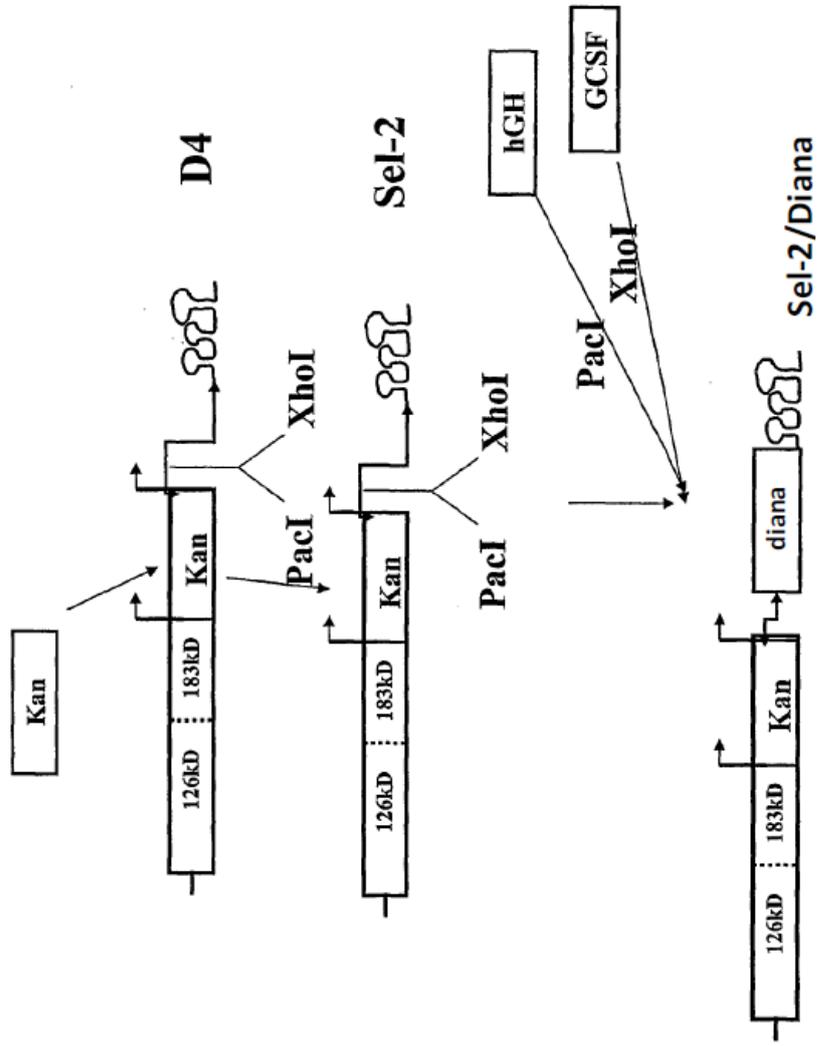


Figura 5

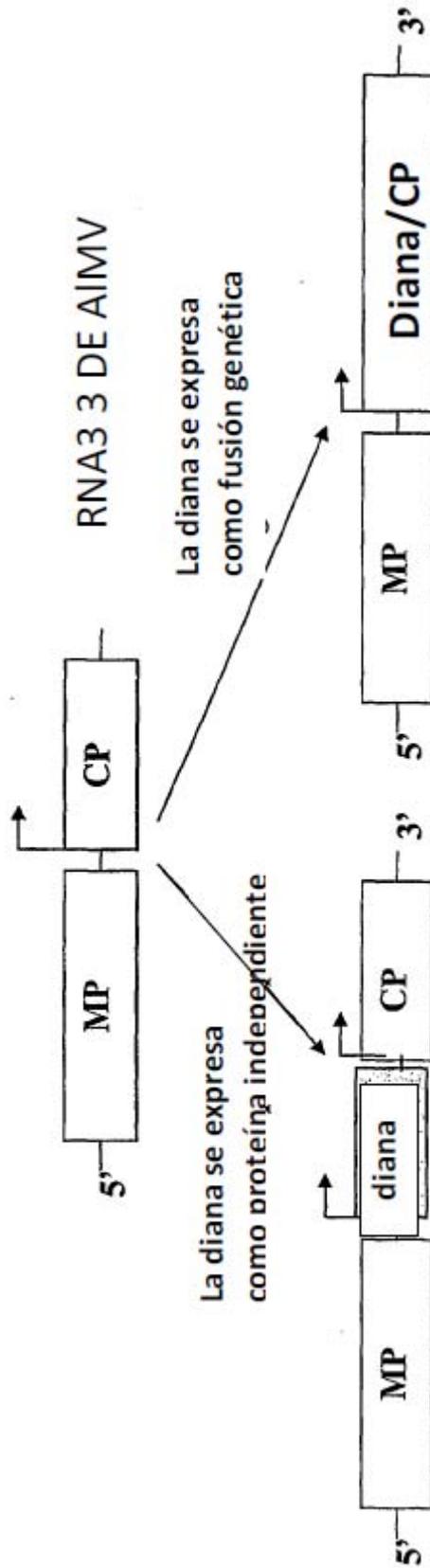


Figura 6
Tecnología de linajes de raíz clonal (CRLT) para
Obtención de Linajes Productores Diana

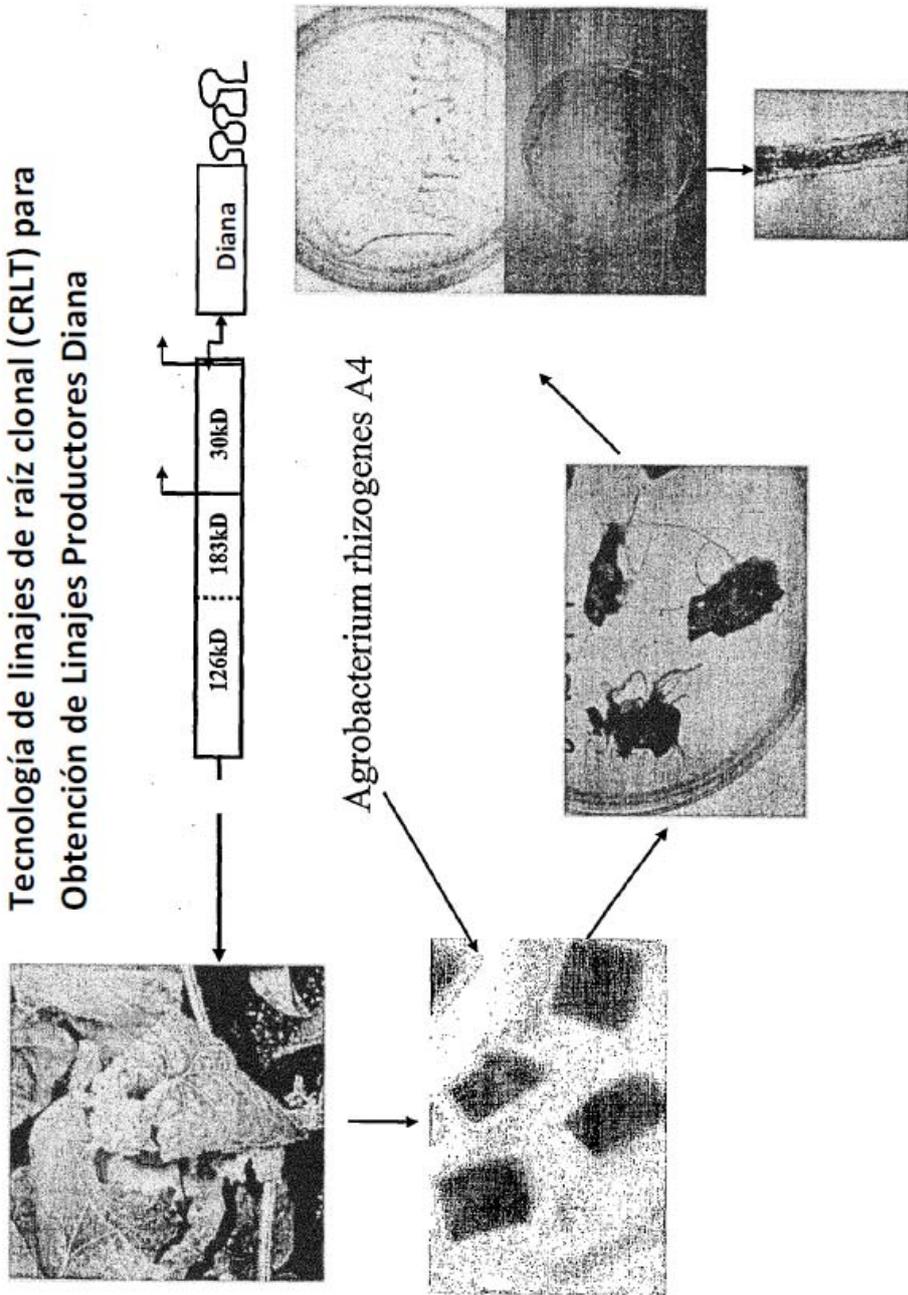
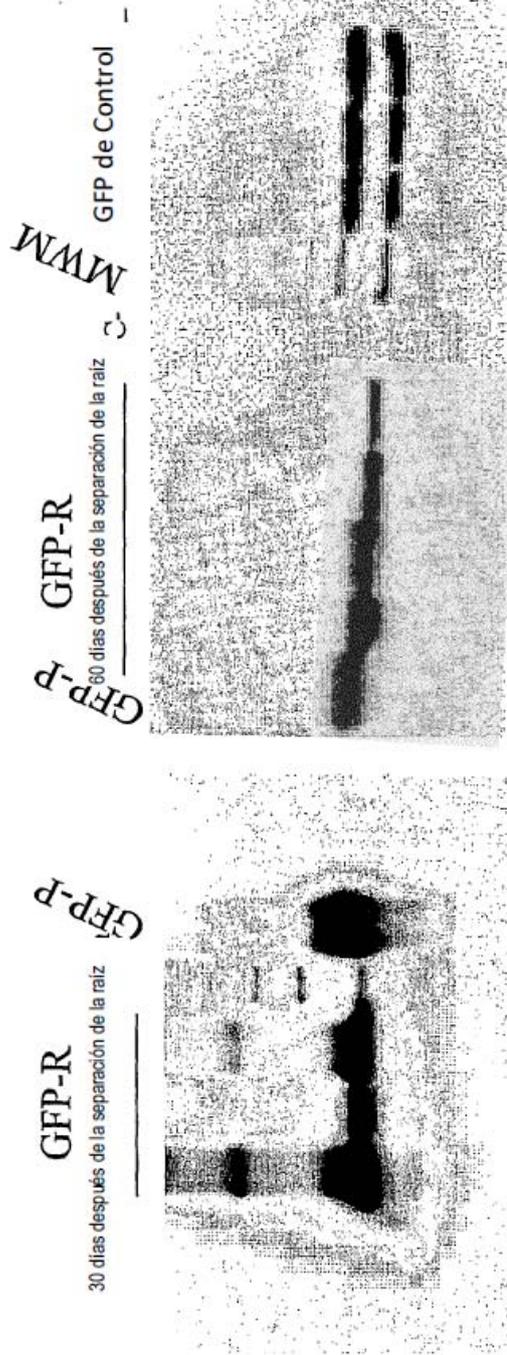
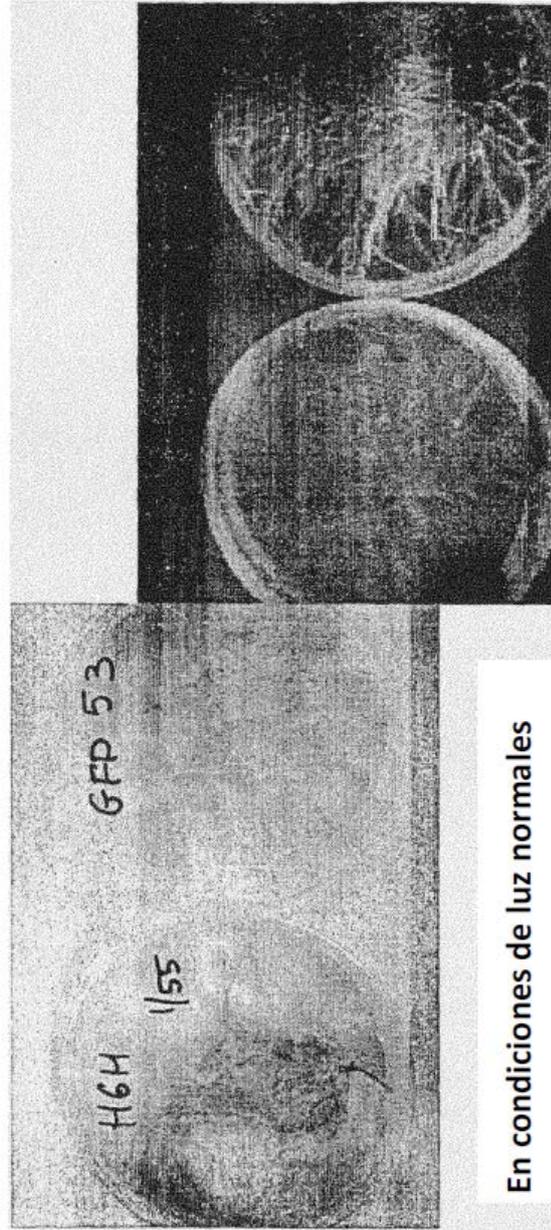


Figura 7
Análisis por transferencia Western de la producción de GFP en linaje de raíces clonales



Anticuerpos específicos de GFP

Figura 8
Linaies de raíz clonales productores de hGH y GFP



Las mismas placas bajo luz UV, 10°
subcultivo para GFP 53 (5 meses
después de la separación de las hojas
de disco)

Figura 9

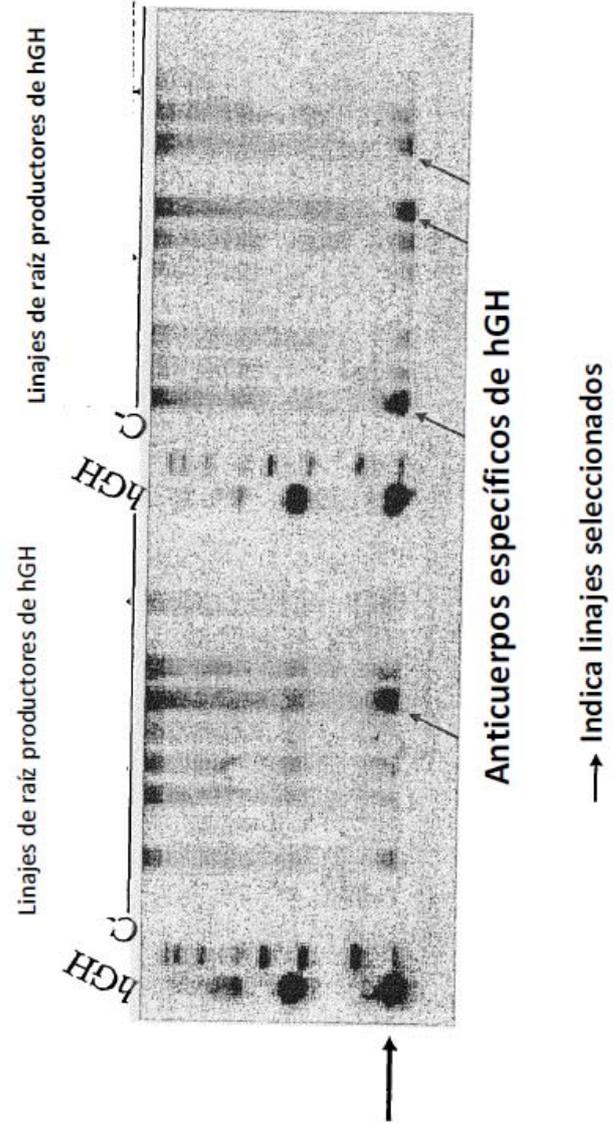
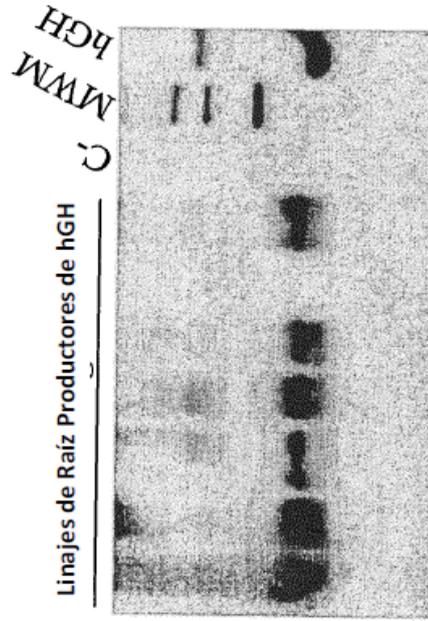
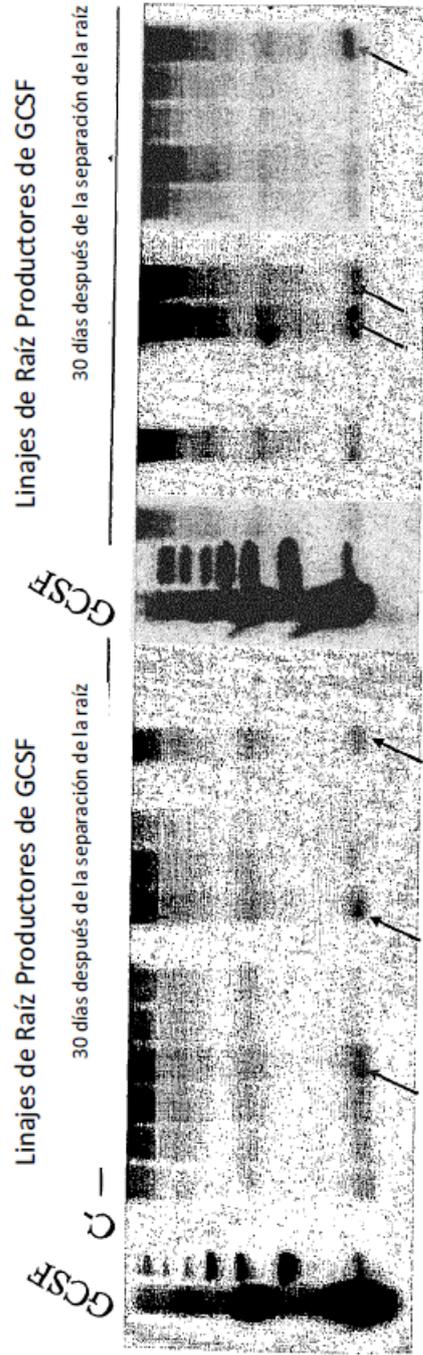


Figura 10
Análisis por Transferencia Western de la Producción de hGH en
Linajes de Raíz Clonal Seleccionados



Anticuerpos específicos de hGH

Figura 11
Cribado y Selección de Linajes de Raíz Clonal Productores de GCSF
por Análisis de Transferencia Western

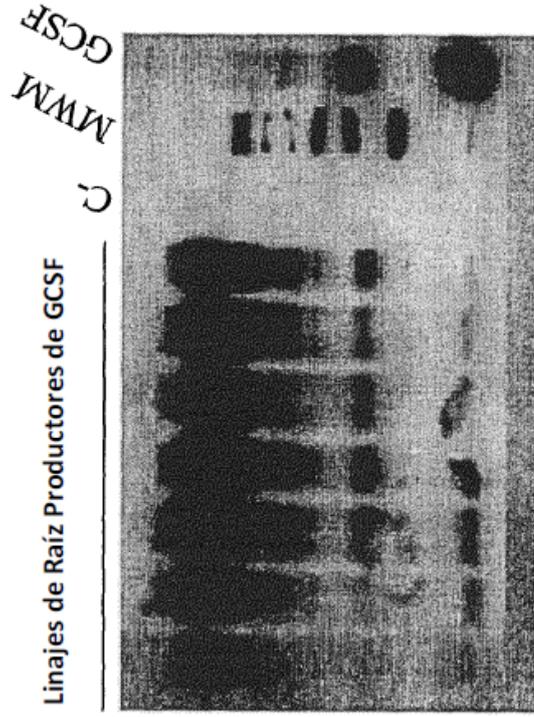


Anticuerpos específicos de GCSF

→ Indica linajes seleccionados

Subcultivo 3d

Figura 12
Análisis por Transferencia Western de la Producción de GCSF en Linajes de Raíz
Clonal Seleccionados



Anticuerpos específicos de GCSF

Figura 13
Tecnología de Linajes de Células Clonales (CCLT) para Obtención
de Linajes Productores Diana

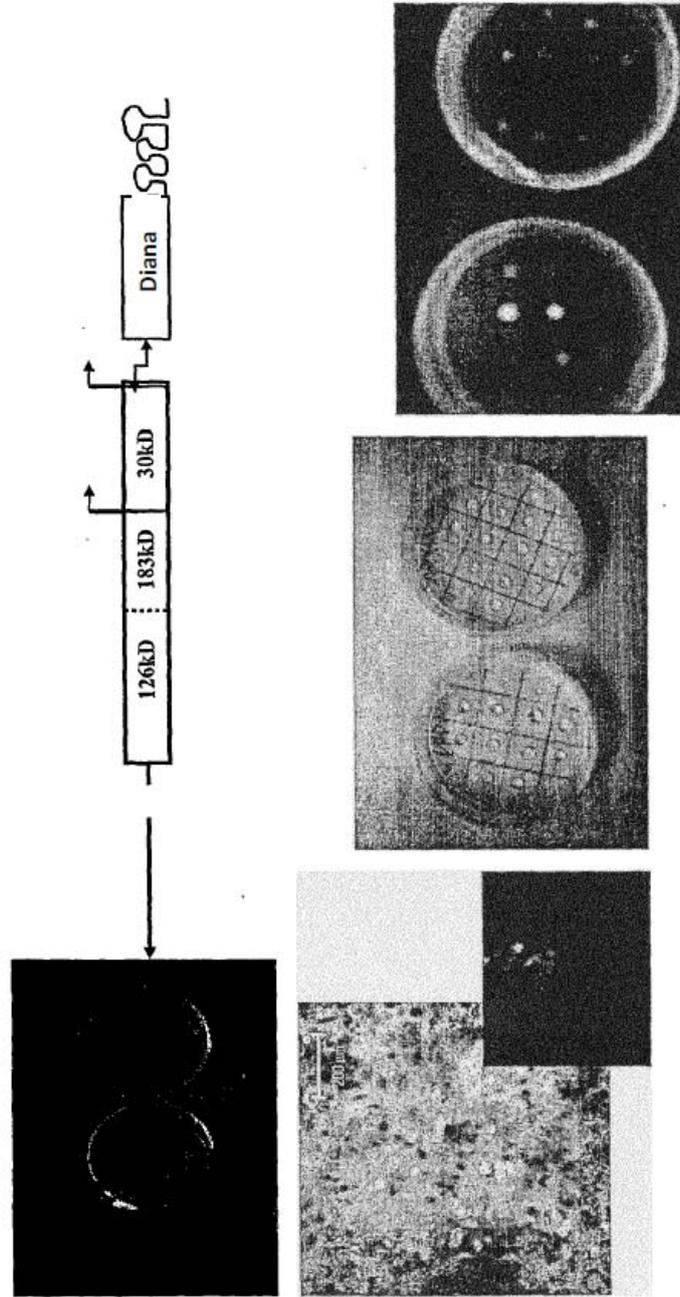
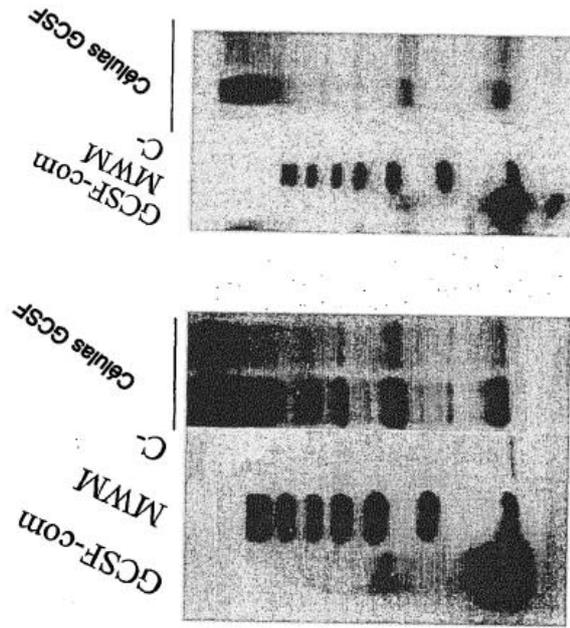


Figura 14

Análisis por transferencia Western de la producción de GCSF en linajes de células

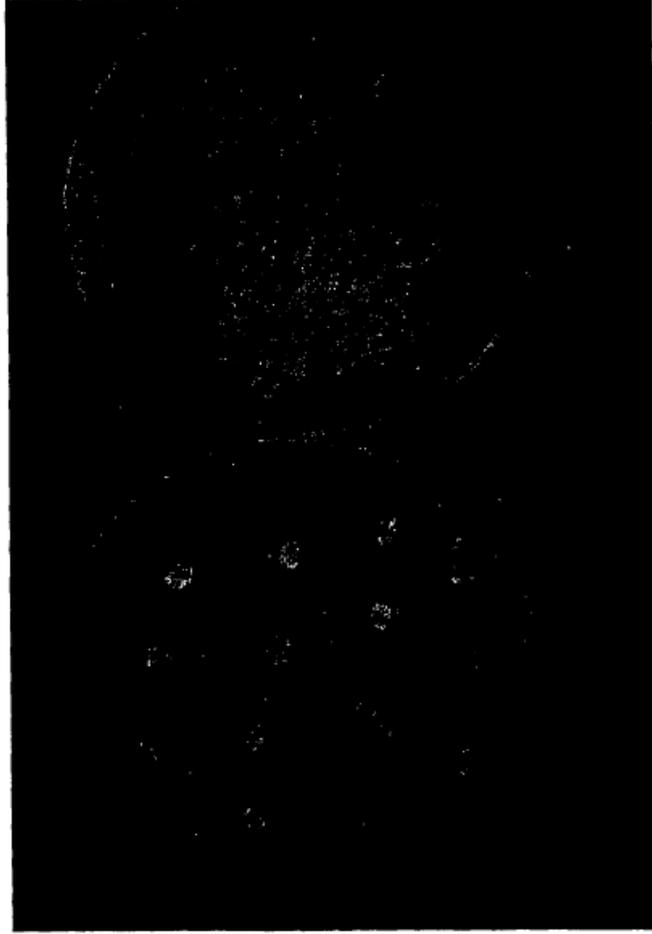


48 horas después de la inoculación

57 días después de la inoculación

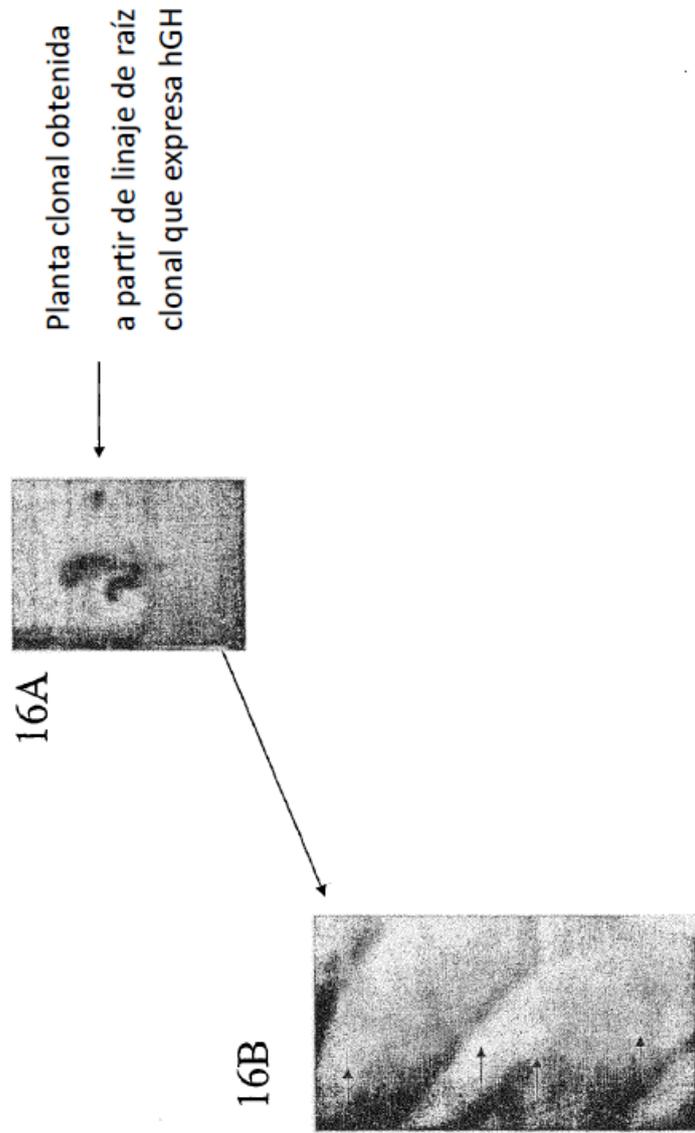
Anticuerpos específicos de GCSF

Figura 15
Linajes de células clonales productoras de GFP



Clones enriquecidos bajo luz UV
(3 meses después de la infección)

Figura 16
Regeneración de Linajes de plantas clonales a partir de linajes de raíz clonales



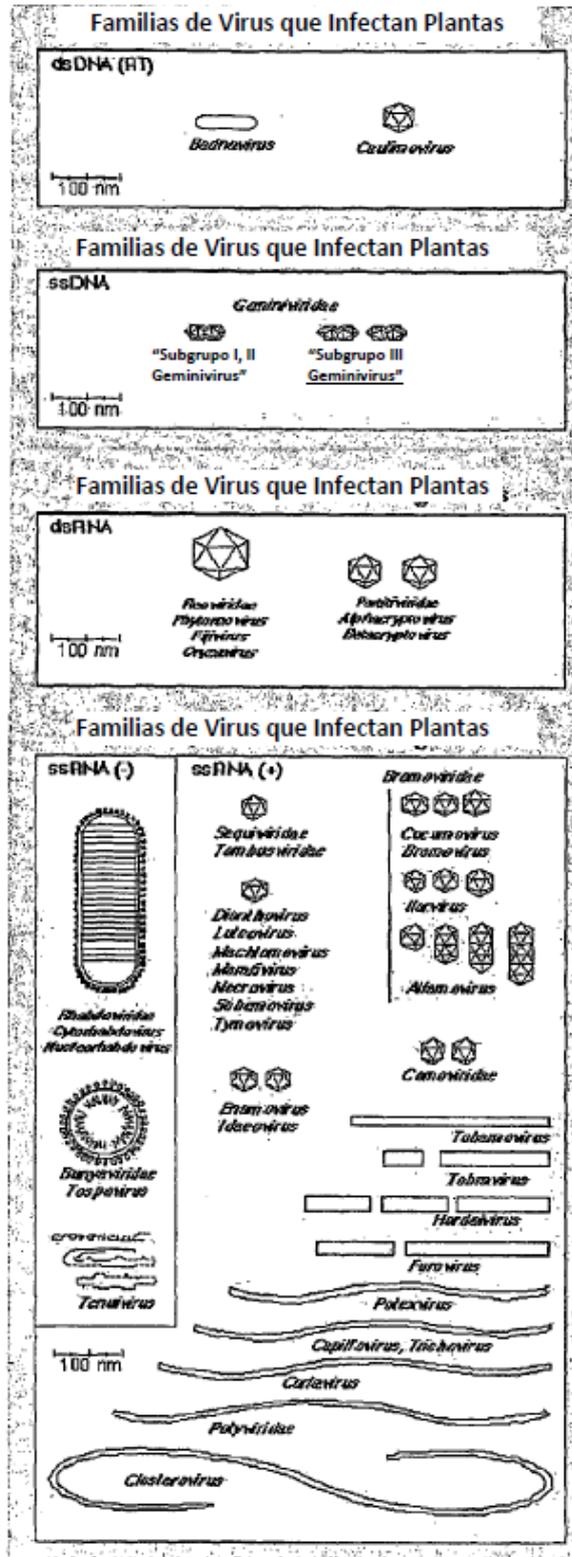


Figura 17

Figura 18

