

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 939**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2010 E 10738233 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2395089**

54 Título: **Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante iARN**

30 Prioridad:

**03.02.2009 ES 200900302**

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

**30.04.2015**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
Serrano 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**BARRO LOSADA, FRANCISCO;  
PISTÓN PISTÓN, FERNANDO;  
GIL HUMANES, JAVIER y  
MARTÍN MUÑOZ, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 534 939 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

Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante iARN

5 La presente invención se refiere al silenciamiento específico de las  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma) y  $\omega$  (omega)-gliadinas de trigo duro y harinero mediante ARN de interferencia (ARNi) por medio del empleo de un polinucleótido que se transcribe a un ARNh (ARN horquilla). Además, la presente invención también se refiere a un vector, célula, planta o semilla que comprenden el polinucleótido, cuya expresión se dirige de forma específica en tejidos concretos de las semillas de trigo mediante secuencias reguladoras de la expresión génica como por ejemplo, el promotor de un gen de  $\gamma$ -gliadinas o el promotor del gen que codifica para una D-hordeína.

## Estado de la técnica anterior

15 La interferencia de ARN (iARN) es un sistema de degradación del ARN mensajero mediado por ARN de doble cadena que permite el silenciamiento específico de determinados genes. Su descubrimiento ha permitido el diseño de vectores compuestos de un promotor y señales de terminación, y entre ellos la secuencia del gen que se desea silenciar, en orientación sentido y antisentido, separados por una secuencia espaciadora de longitud variable.

20 Los ARNip (de las siglas en inglés para ARN interferente pequeño o ARN interferente corto) son moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh de las siglas en inglés para ARN de doble hebra) de 21-25 nucleótidos (nt), que se originan a partir de un ARNdh precursor más largo. Los ARNdh precursores pueden ser de origen endógeno, en cuyo caso se habla de miARN (codificados en el genoma del organismo) o de origen exógeno (como virus o transgenes). Tanto ARNip como miARN son dos tipos de ARNi (ARN de interferencia). El ARNi suprime la expresión post-transcripcional de un determinado ARNm (de las siglas en inglés para ARN mensajero) reconocidos por la secuencia de ARNi.

25 Cuando una célula recibe un ARNdh precursor (los ARN de hebra simple no producen este efecto), que puede generarse a partir de un transgén exógeno, un agente viral o un elemento genético propio, se fragmenta en ARNip por la acción de una enzima denominada Dicer, una enzima citoplásmica de la familia RNasa III. Dicer corta el ARNdh en fragmentos de doble cadena de alrededor de 21-25 nucleótidos (ARNip), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del ARNip solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del ARNip determinan cuál de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5', bien porque contenga un mayor contenido de bases AU o bien por apareamientos imperfectos. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional la hebra guía debe ser complementaria al ARNm que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al ARNm complementario de la hebra guía del ARNip presente en el complejo y se produce el corte del ARNm. Posteriormente se produce la degradación de los fragmentos obtenidos. De esta manera, los ARNip provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de estas secuencias.

45 En trigo, las proteínas del grano, aunque minoritarias (7-18 %) respecto a los hidratos de carbono (60-75 %), son fundamentales para las propiedades funcionales de la harina. Las principales proteínas del grano son las gluteninas y las gliadinas, que constituyen el gluten. Las gliadinas son responsables del desarrollo de la enfermedad celíaca ya que epítomos (determinantes antigénicos) reconocidos por las células T intestinales han sido identificados en regiones de  $\alpha$  y  $\gamma$ -gliadinas (Arentz-Hansen, *et al.*, 2002. Gastroenterology 123:803-809). Las personas que sufren la enfermedad celíaca tienen intolerancia al gluten. La intolerancia al gluten se caracteriza por una inflamación crónica de la parte proximal del intestino delgado, causada por la exposición de gliadina. Mediante un trigo que tenga muy disminuido el contenido de gliadinas, se podría elaborar un alimento para celíacos.

50 Se conocen cuatro tipos de gliadina;  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma) y  $\omega$  (omega). La supresión de gliadinas de granos de trigo empleando la tecnología de iARN se ha venido utilizando en los últimos años. Hasta la fecha, solamente se ha conseguido suprimir una parte de las gliadinas. Por ejemplo, mediante el empleo de construcciones genéticas que dan lugar a iARN de tipo horquilla, cuya estructura es: Promotor–Secuencia sentido–Espaciador–Secuencia antisentido–Terminador, se han conseguido eliminar gliadinas del tipo  $\alpha$  (Folck *et al.*, 2005. XII International Conference on Plant Embryology. Oral presentation) o del tipo  $\gamma$  (Gil-Humanes *et al.* 2008. Journal of Cereal Science 48(3):565-568), casi por completo, pero no se han conseguido eliminar todos los tipos de gliadinas de manera eficaz.

60 La obtención de plantas que tengan muy reducida la cantidad de gliadinas en sus semillas presenta dificultades técnicas como son, en primer lugar, el número elevado de genes que codifican para gliadinas y, en segundo lugar, que las plantas de trigo son hexaploides. Conseguir una transformación estable en las plantas de trigo presenta más dificultades que la transformación de cualquier otra planta con menor número de copias del genoma.

**Explicación de la invención**

La presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias donde cada subsecuencia se combina en un orden determinado para dar lugar a una secuencia cuya transcripción a ARN sea capaz de originar un ARNh (ARN horquilla), es decir, un ARN en forma de horquilla, un ARN de doble hebra que será procesado por endorribonucleasas descritas en el estado de la técnica, por mediación de las cuales se generan los ARNip que producen el silenciamiento post-transcripcional de todos los ARNm (ARN mensajeros) que codifican para todos los tipos de gliadinas de trigo. Para ello, las cuatro subsecuencias son; la secuencia en orientación sentido de las  $\omega$ -gliadinas, la secuencia en orientación sentido de las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas y las dos secuencias anteriores en orientación antisentido.

Mediante este polinucleótido, cuya expresión se dirige de forma específica en tejidos concretos de las semillas de trigo mediante secuencias reguladoras de la expresión génica como por ejemplo, el promotor de un gen de  $\gamma$ -gliadinas o el promotor del gen que codifica para una D-hordeína, se consigue el silenciamiento post-transcripcional de todos los genes de especies de trigo blando y de especies de trigo duro de manera eficaz y sinérgica, ya que se consiguen silenciar más cantidad de genes de gliadinas cuando se comparan con los resultados de silenciamiento de  $\alpha$  y  $\gamma$ -gliadinas mediante ARNh que se describen en el estado de la técnica. Ello se debe fundamentalmente al diseño específico de las subsecuencias en orientación sentido y antisentido cuyos ARNip generados hibridan con todos los ARNm de las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas de trigo en combinación con promotores de las gliadinas con niveles de expresión más elevados, inducibles en tejidos específicos de la semilla de trigo. Este diseño se ha llevado a cabo mediante la identificación de grupos de gliadinas que contienen epítomos reconocidos por las células T humanas, de modo que el silenciamiento de las proteínas que los contienen da lugar a semillas de trigo con las que se pueden obtener productos aptos para personas que presentan alergia al gluten.

En la presente invención se emplean los términos ADN o ARN para referirse al ácido desoxirribonucleico o al ácido desoxirribonucleico respectivamente.

En este sentido, un aspecto de la presente invención es un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde:

- a. las secuencias a1, a2, b1 y b2 son diferentes entre sí y se seleccionan de entre SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4, de la siguiente forma:
- b. si a1 es SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4, b1 es SEC ID N° 4 o SEC ID N° 1 y a2 es SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3, y
- c. si a1 es SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3, b1 es SEC ID N° 3 o SEC ID N° 2 y a2 es SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4.

Otro aspecto de la presente invención es un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde las secuencias a1, a2, b1 y b2 se describen en los apartados (a) a (c) del aspecto anterior.

Las secuencias a1-a2 y b2-b1 (en adelante, pares de secuencias de la invención), están unidas formando una secuencia lineal y continua de nucleótidos, a su vez, ambos pares están unidos entre sí por medio de una secuencia espaciadora cuya longitud es de al menos un nucleótido. Preferiblemente la secuencia espaciadora es una secuencia no codificante que es eliminada tras el procesado del ARNdH formado. La secuencia espaciadora puede ser parte de una secuencia de un intrón de un gen. La función de la secuencia espaciadora es actuar de bisagra de los pares de secuencias descritos para que se pueda producir el apareamiento o hibridación de las secuencias de ARN codificadas por el polinucleótido.

SEC ID N° 1 es la secuencia en orientación sentido que contiene parte del fragmento que codifica los epítomos de  $\omega$ -gliadinas reconocidos por las células T humanas que dan lugar a una respuesta inmune en personas que padecen enfermedad celíaca. SEC ID N° 2 es la secuencia en orientación sentido que contiene parte del fragmento que codifica los epítomos de  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -gliadinas. SEC ID N° 3 es la secuencia antisentido de SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4 es la secuencia antisentido de SEC ID N° 1.

El polinucleótido de la invención da lugar a un ARN donde los dos pares de secuencias hibridan entre sí formando una horquilla. Por tanto, según estos dos primeros aspectos de la presente invención, las combinaciones de secuencias mediante las cuales pueden obtenerse horquillas de ARN se representan en la tabla 1 y en la tabla 2:

Tabla 1. Combinaciones de secuencias donde los pares a1-a2 y b2-b1 son secuencias sentido o antisentido.

Combinaciones	a1	a2	b2	b1
1	SEC ID N° 1	SEC ID N° 2	SEC ID N° 3	SEC ID N° 4
2	SEC ID N° 2	SEC ID N° 1	SEC ID N° 4	SEC ID N° 3
3	SEC ID N° 3	SEC ID N° 4	SEC ID N° 1	SEC ID N° 2
4	SEC ID N° 4	SEC ID N° 3	SEC ID N° 2	SEC ID N° 1

Tabla 2. Combinaciones de secuencias donde los pares a1-a2 y b2-b1 contienen secuencias sentido y antisentido.

Combinaciones	a1	a2	b2	b1
1	SEC ID N° 1	SEC ID N° 3	SEC ID N° 2	SEC ID N° 4
2	SEC ID N° 3	SEC ID N° 1	SEC ID N° 4	SEC ID N° 2
3	SEC ID N° 2	SEC ID N° 4	SEC ID N° 1	SEC ID N° 3
4	SEC ID N° 4	SEC ID N° 2	SEC ID N° 3	SEC ID N° 1

En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde a1 es SEC ID N° 1, a2 es SEC ID N° 2, b2 es SEC ID N° 3 y b1 es SEC ID N° 4.

Según otra realización preferida, el polinucleótido comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) donde la secuencia espaciadora es SEC ID N° 5. La secuencia SEC ID N° 5 es un fragmento de un intrón del gen *Ubi1* que codifica para la Ubiquitina de maíz. Un intrón es una región del ADN que es eliminada del transcrito primario de ARN mediante un proceso que se denomina corte y ajuste, es decir, el intrón no codifica para ninguna secuencia de una proteína. La ubiquitina es una proteína cuya función es la de marcar otras proteínas para su destrucción.

Otra realización preferida es un polinucleótido que además comprende una secuencia reguladora de la expresión génica unida funcionalmente a su extremo 5'. En la presente invención, el término "secuencia reguladora de la expresión génica" hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad del gen en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de una secuencia de ADN o al inicio de traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias no descritas. A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones. La secuencia reguladora se une al extremo 5' del polinucleótido de la presente invención de forma funcional, es decir, que es capaz de dirigir la expresión del polinucleótido con una intensidad y localización que dependen de la propia secuencia reguladora.

Según una realización más preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica es SEC ID N° 6 y/o SEC ID N° 7. La secuencia SEC ID N° 6 corresponde con la secuencia de un promotor del gen  $\gamma$ -gliadina que presenta una duplicación en una caja prolina. SEC ID N° 7 corresponde con la secuencia de un promotor del gen D-Hordeína (la secuencia nucleotídica de este gen tiene un número de acceso AY998009 y pertenece a la especie *Hordeum chilense*). Ambos promotores se expresan en el endospermo de las semillas.

También se contemplan las secuencias complementarias de cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención.

En adelante, para referirse a cualquiera de los polinucleótidos anteriores, se usará el término "polinucleótidos de la invención" o "polinucleótidos de la presente invención".

Otro aspecto de la presente invención es una secuencia de ARN, codificada por cualquiera de los polinucleótidos de la invención, capaz de formar un ARNh donde la secuencia codificada por el par a1-a2 hibrida completamente con la secuencia codificada por el par b2-b1.

Un ARNh (de las siglas en para ARN horquilla) es una horquilla formada por la hibridación de las secuencias transcritas. En la presente invención, para la síntesis de las secuencias transcritas se ha usado como molde el polinucleótido de la invención donde los pares de secuencias a1-a2 y b2-b1 hibridan completamente entre sí, tal como se observa en la figura 1B. Un ARNh es un ARN de doble hebra (ARNdh) que es cortado por una endorribonucleasa, por ejemplo, la endorribonucleasa Dicer, dando como resultado fragmentos de alrededor de 21-25 nt. Estos fragmentos se conocen como ARNip. Tal como se ha descrito anteriormente, los ARNip provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de las secuencias de ARNm.

Un aspecto más de la presente invención es al menos un ARNip generado a partir de la secuencia del ARNh según el aspecto anterior. El ARNip también se puede denominar iARN. El ARNip es un ARN de doble hebra de entre 21 y 25 nucleótidos, pero sin limitarse a este número de nucleótidos, que se genera a partir de la secuencia del ARNh de la invención. En la presente invención, al definir el número de nucleótidos aproximado (de alrededor de 21 y 25 nucleótidos) del ARNip se entiende que hay otra hebra complementaria a esa secuencia, es decir, que se puede hablar indistintamente de nucleótidos o pares de bases (pb).

Como se ha descrito, la enzima Dicer corta el ARNdH en fragmentos de doble cadena de alrededor de 21-25 nucleótidos (ARNip), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del ARNip solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del ARNip determinan cuál de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5'. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional, la hebra guía debe ser

complementaria al ARNm que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al ARNm complementario de la hebra guía del ARNip presente en el complejo y se produce el corte del ARNm.

5 Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En adelante, “vector de la invención” o “vector de la presente invención”.

10 El término “vector” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector comprende el polinucleótido de la invención que fusionado al mismo puede replicarse en el huésped correspondiente. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

15 Un aspecto más de la presente invención es una célula aislada transfectada con el vector de la invención. En adelante, “célula de la invención” o “célula de la presente invención”. El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el ADN de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino *Plantae*. Así pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

25 El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transfección para métodos no-virales es usado en referencia a células eucarióticas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas. En el caso de la presente invención, el término transfección es equivalente al término transformación.

35 Otro aspecto de la presente invención es una planta modificada genéticamente que comprende la célula de la invención. El término “planta” engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación, así como el germoplasma. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o por los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo (ver más adelante semillas, propágulos o progenie). La planta debe comprender la célula de la presente invención de forma que se exprese en un tejido específico (en un momento concreto del desarrollo vegetativo o dependiendo de las condiciones ambientales en donde se desarrolla) o de forma constitutiva o de forma ectópica (que se expresa en otras células o tejidos diferentes de las habituales y esperadas).

40 La planta de la invención puede contener el polinucleótido de la invención en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

45 Según una realización preferida, la planta pertenece al género *Triticum*. La planta se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Triticum aestivum*, *T. aethiopicum*, *T. araraticum*, *T. boeoticum*, *T. carthlicum*, *T. compactum*, *T. dicoccooides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. ispahanicum*, *T. karamyshevii*, *T. macha*, *T. militinae*, *T. monococcum*, *T. polonicum*, *T. repens*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. timopheevii*, *T. turanicum*, *T. turgidum*, *T. urartu*, *T. vavilovii* o *T. zhukovskyi*.

50 Según otra realización preferida, la planta es de la especie *Triticum aestivum* o *Triticum turgidum*. Según otra realización preferida la planta pertenece al cultivar Bobwhite o al cultivar Don Pedro. Más preferiblemente se seleccionan los cultivares BW208 y BW2003 (Bobwhite) que pertenecen a la especie de trigo *Triticum aestivum* L. ssp *aestivum* y la variedad Don Pedro pertenece a la especie de trigo *Triticum turgidum* L. ssp *durum*.

55 Bobwhite es el nombre del cultivar, obtenido en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). BW208 y BW2003, son diferentes líneas de Bobwhite. Don Pedro es una variedad de trigo duro también del CIMMYT. Bobwhite y Don Pedro son variedades públicas.

60 La planta de la invención puede conseguirse por transformación genética de células vegetales mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración del polinucleótido de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial seguida, aunque no necesariamente, de un programa de regeneración *in vitro* adecuado a las características y necesidades de la especie vegetal transformada. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga el polinucleótido de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan el polinucleótido de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los

- métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo, por ejemplo, se podría llevar a cabo la transformación genética de células germinales de espigas tal como se ha mencionado pero sin necesidad de tener que regenerar una planta posteriormente (ver más adelante). Asimismo también se incluye la planta que comprende la célula de la presente invención de forma estable o de forma transitoria.
- Otro aspecto de la presente invención es una semilla que procede de cualquiera de la plantas de la invención. En adelante, “semilla de la invención” o “semilla de la presente invención”.
- Un aspecto más de la presente invención es un grano de polen, propágulo, progenie o parte de la planta que procede de cualquiera de las plantas de la invención.
- En la presente invención se tiene en cuenta el polen como transmisor de los caracteres genéticos y fenotípicos, que puede llevarse a cabo por la polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende el polinucleótido de la presente invención y, tras los respectivos cruces y/o selecciones, se puede obtener una planta en la que la secuencia está integrada de forma estable (aunque también pueden expresarse de forma transitoria) y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.
- Los propágulos son partes de la planta que permiten la propagación o reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas u órganos individualizados. Los tejidos de la porción separada deben recuperar la condición de meristemas para producir todo el conjunto de órganos de la planta. El propágulo se selecciona, pero sin excluir, de la lista que comprende estolones, rizomas, tubérculos o bulbos.
- El término “progenie” hace referencia al resultado de la reproducción, es decir, el individuo o individuos producidos mediante la intervención de uno o más individuos parentales. Por ejemplo, la progenie de las plantas, obtenida mediante reproducción sexual, son las semillas, sin embargo la progenie de una planta puede ser cualquier célula resultante de la fusión de cualquier contenido celular, plasto, compartimento celular, ADN o cualquiera de sus combinaciones. En los procesos de división celular (como por ejemplo en el cultivo *in vitro*) la progenie son las células resultantes de la división.
- Otro aspecto de la presente invención es el uso del polinucleótido, vector o célula de la invención para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.
- Tal como se demuestra en el ejemplo 2 de la presente invención, la integración del polinucleótido de la invención en el genoma de plantas de trigo de dos genotipos de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.); cultivar Bobwhite (BW208 y BW2003), y uno de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*); cultivar Don Pedro, produce el silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas de las semillas de plantas transformantes (FIG. 3, FIG. 4 y FIG. 5).
- Un aspecto más de la presente invención es el uso de la semilla de la invención para preparar una composición alimenticia (en adelante “composición de la invención” o “composición de la presente invención”). La composición alimenticia se prepara, por ejemplo, pero sin limitarse, a partir de la harina y/o sémola de las semillas de la invención en combinación o no con otras harinas y/o sémolas, u otros compuestos.
- El término “harina” según se entiende en la presente invención, es el producto obtenido de la molturación de cualquier semilla de plantas del género *Triticum* despojado en mayor o menor grado del salvado o la cascarilla de la semilla.
- El término “sémola” hace referencia a la harina gruesa (semillas de trigo poco molidas), es decir, fragmentos de endospermo con una cantidad variable de cascarilla de semilla.
- El alimento preparado se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende pan, productos de bollería, productos de pastelería, productos de repostería, pasta alimenticia, masa alimenticia, cereales, bebidas o lácteos.
- Otro aspecto de la invención es el uso de la composición de la invención para preparar un alimento funcional, complemento vitamínico o complemento nutricional. Tal como se entiende en la presente invención, un alimento funcional cumple una función específica como puede ser la de mejorar la dieta de las personas que lo consumen. Para ello al alimento funcional se le puede agregar un complemento vitamínico y/o complemento nutricional.
- El alimento que comprende la composición alimentaria de la presente invención puede ser consumido incluso por personas que tienen alergias al gluten, es decir, que padecen la enfermedad celiaca.
- Un aspecto más de la presente invención es un método para la obtención de la planta de la invención, que comprende:

- a. seleccionar una parte de la planta,
- b. transfectar las células de la parte de la planta del apartado (a) con el vector según la reivindicación 9,
- c. seleccionar la célula transfectada del apartado (b) que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- d. regenerar al menos una planta procedente de la célula seleccionada en el apartado (c),
- e. seleccionar una o varias plantas regeneradas según el apartado (d) donde el polinucleótido se transcribe a un ARNh,
- f. seleccionar una o varias plantas obtenidas según el apartado (e) que presentan silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.

En el caso de las plantas de trigo se selecciona preferiblemente el escutelo para ser transfectado por el vector de la invención. La inserción del polinucleótido de la presente invención en un vector se puede llevar a cabo por medio de los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte del polinucleótido y el vector con enzimas de restricción (digestión) y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre el polinucleótido de la invención. El vector ha sido definido en un párrafo anterior.

La selección del vector que comprende la secuencia de la invención escogida, puede llevarse a cabo mediante técnicas como:

- Selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector.
- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento de alguna de las secuencias de la invención insertada en el vector.

La célula se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*) o tejido vegetal.

La transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, electroporación, transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la célula. Preferiblemente la transformación se lleva a cabo por medio de biolística. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose. También se incluyen las células que comprenden cualquiera de las secuencias de la invención de forma transitoria.

La célula transformada con un vector que incluye cualquiera de los polinucleótidos de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, en este caso se suele insertar el ADN, que contiene, entre otras secuencias, el polinucleótido de la invención. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos o herbicidas está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del ADN del vector. También se puede seleccionar la célula que comprende el polinucleótido de la invención mediante cualquier otra técnica que permita discriminar su presencia o ausencia y/o su expresión.

Las células vegetales seleccionadas, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede.

Esto es posible gracias a que las células vegetales son totipotentes, es decir, mediante la combinación hormonal adecuada se las puede desdiferenciar y originar células embrionarias, que al contener una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenecen, tienen el potencial para regenerar una nueva planta completa. Además son necesarias condiciones de luz y temperatura idóneas para cada especie vegetal. Una vez que se ha regenerado la planta procedente de la célula vegetal seleccionada, se puede llevar a cabo un análisis de la presencia y/o de la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para el polinucleótido de la invención o de cualquier otra secuencia de la presente invención (secuencia promotora, etc.).

El método comprende, además, la selección de una planta que presenta un silenciamiento sustancial de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas. Preferiblemente se seleccionan las plantas que presentan un silenciamiento casi completo o completo de todas las gliadinas de las semillas. La reducción del contenido total de gliadinas respecto de una planta control (planta que no comprende el polinucleótido de la invención) es mayor o igual del 90 %. Preferiblemente las plantas control no contienen el polinucleótido de la invención en la célula vegetal. El control también puede ser una planta tipo salvaje antes de ser transformadas, que ha pasado por los mismos pasos de cultivo *in vitro* que las plantas de la invención o que no ha pasado por estos pasos de cultivo.

Las células transfectadas pueden ser células germinales de la espiga de la planta y, en este caso, se regeneraría al menos una planta procedente de las semillas generadas por la citada espiga de la planta y se seleccionaría al menos una planta que presente silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

## Descripción de las figuras

### FIG. 1. Muestra la estructura del polinucleótido de la invención.

15 La figura A muestra un polinucleótido que comprende los pares de secuencias a1-a2 y b2-b1, separados por una secuencia espaciadora (E) y cuya expresión está dirigida por una secuencia reguladora de la expresión génica (R).

La figura B muestra el ARNh resultante de la transcripción del polinucleótido representado en la figura A en el que se forma una horquilla donde las secuencias Sec a1, a2, b2 y b1 hibridan tal como se describe. Posteriormente, este ARN es procesado, produciéndose una nueva secuencia de ARN de doble hebra (ARNdh). El último paso representado se refiere al fraccionamiento de la secuencia anterior por medio de enzimas como por ejemplo la enzima Dicer de modo que se forman secuencias de ARN de doble hebra de unos 21-25 nucleótidos, llamados ARNip (ARN interferente pequeño).

### FIG. 2. Muestra un ejemplo concreto del polinucleótido de la invención.

25 En este caso, la secuencia R es una secuencia promotora del gen de gamma-gliadina ( $\gamma$ -Gliadina) o de D-Hordeína. La secuencia E es un fragmento de un intrón del gen de la Ubiquitina de maíz. NOST es una secuencia terminadora de la transcripción. Este polinucleótido se inserta, en este ejemplo concreto, en un vector pUC18 que tiene un gen de resistencia a ampicilina.

### FIG. 3. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo BW208, por las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF, transformadas con el polinucleótido de la invención.

30 La figura A muestra la separación mediante A-PAGE de las gliadinas de la muestra de semillas de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW208 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  (B377-2-3). Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

La figura B muestra un análisis de gliadinas por MALDI-TOF de una muestra de semillas de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW208 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ . En la gráfica correspondiente a la línea control se indican las diferentes fracciones de alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y omega ( $\omega$ )-gliadinas. El eje X representa la relación (m/z) entre la masa de un ión dado (m) y el número de protones que contiene (z).

### FIG. 4. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo BW2003, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

40 Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW2003 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ . Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

### FIG. 5. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo duro Don Pedro, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

45 Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea de trigo duro control (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) variedad Don Pedro y una línea de trigo duro del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ . Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

### FIG. 6. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de BW208, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

50 Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea control BW208 y tres semillas de una línea (B382-4-1) del mismo genotipo transformada con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ . Se indican los grupos de gliadinas. Nótese que el promotor que contiene este vector es promotor D-Hordeína (SEC ID N° 7).

### FIG. 7. Muestra el análisis por transferencia de Western de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) transformadas con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ .

55 A: Las gliadinas de tres granos de la línea B382-4-1, denotados como I1, I2, I3, del genotipo BW208 se han separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.

60 B: Las gliadinas de dos granos de la línea B374-6-2, denotados como O2 y O3, del genotipo BW2003 se han separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.

Los números a la izquierda de A indican el peso molecular en KDa tanto para A como para B.

### FIG. 8. Muestra el análisis por transferencia de Western de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) de la variedad BW208 transformadas con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ .

65 Las gliadinas de tres granos de la línea transgénica B375-3-1, denotados como A1, A2, A3 y las gliadinas de dos granos de trigo de la línea transgénica B377-2-3, denotados como C1 y C2, ambas del genotipo BW208 se han



separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.  
Los números a la izquierda de la figura indican el peso molecular en KDa.

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la construcción del polinucleótido de la invención, la generación de plantas de trigo de 3 variedades distintas transformadas con el vector de la invención y los análisis del contenido de gliadinas por las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF.

### Ejemplo 1. Construcción de los vectores pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ y pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ .

#### 1.1 Síntesis de las secuencias $\alpha/\beta/\gamma$ y $\omega$ -gliadinas.

Las secuencias de ADN depositadas en el *Genebank* pertenecientes a  $\alpha/\beta/\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas de trigo se alinearon por separado y se identificaron las regiones que presentaban un mayor grado de homología. A partir de estos alineamientos se seleccionó una secuencia de 170 pb de  $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadinas y otra de 191 pb de  $\omega$ -gliadinas y se diseñaron los cebadores Alpha\_hp-F (SEC ID N° 8) y Alpha\_hp-R (SEC ID N° 9) para la amplificación del fragmento  $\alpha/\beta/\gamma$  y los cebadores Omega\_III-F (SEC ID N° 10) y Omega\_III-R (SEC ID N° 11) para la amplificación del fragmento  $\omega$  (Tabla 1). Las condiciones de PCR para ambos fragmentos fueron: ADNc de *T. aestivum* cv Bobwhite sintetizado a partir de 50 ng de ARN total extraído de granos inmaduros, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 1x tampón y 0,625 unidades de una mezcla de polimerasas en una relación 100:1 de *Tth* (*Thermus thermophilus*) y *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) (BIOTOOLS, Madrid, España) en una reacción final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94 °C 5 min, 35 ciclos de 94 °C 30 seg, 55 °C 30 seg y 72 °C 30 seg; y una extensión final de 72 °C 4 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems). Los productos de cada PCR se purificaron utilizando el *GFX PCR DNA Purification Kit* (Amersham Biosciences, Amersham, RU) y fueron secuenciados por la empresa Secugen SL. Para conseguir el solapamiento de los fragmentos  $\alpha/\beta$  y  $\omega$  se volvió a amplificar el fragmento de  $\omega$ -gliadinas utilizando un cebador solapante (Omega III R solapante (SEC ID N° 12) junto con el cebador directo SEC ID N° 10) y el fragmento  $\alpha/\beta$ -gliadinas utilizando otro cebador solapante Alfa F solapante (SEC ID N° 13) junto con el cebador reverso SEC ID N° 9) que añadían a cada fragmento 12 pares de bases complementarias al otro fragmento. Mediante estas últimas amplificaciones se obtuvieron dos fragmentos que complementan entre el extremo 3' del fragmento de  $\omega$ -gliadinas y el extremo 5' del fragmento  $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadinas. Las condiciones de las PCR fueron las mismas que las descritas anteriormente; el producto de éstas se separó en un gel de agarosa 1 % y la banda correspondiente a cada fragmento se purificó con el *QUIAquick Gel Extraction Kit* (QUIAGEN Inc., Valencia, CA). La PCR solapante final se llevó a cabo utilizando 10ng del fragmento  $\alpha/\beta/\gamma$  solapante purificado, 10 ng del fragmento  $\omega$  solapante purificado, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M del cebador alpha\_hp-F, 0,2  $\mu$ M del cebador omega\_III-R, 1x tampón y 0,625 unidades de una mezcla 100:1 de *Tth/Pfu* polimerasas en una reacción final de 50 $\mu$ l. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94 °C 2min, 35 ciclos de 94 °C 30 seg, 57 °C 30 seg y 72 °C 30 seg; y una extensión final de 72 °C 4 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems). El producto de PCR se separó en un gel de agarosa 1 % y la banda que presentaba el tamaño correspondiente al fragmento  $\omega/\alpha/\beta$  (361 pb) se purificó con el *QUIAquick Gel Extraction Kit* (QUIAGEN Inc., Valencia, CA) y se clonó en el plásmido TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido contiene los sitios *attL1* y *attL2* que permiten la transferencia mediante recombinación del gen de interés en cualquier vector *Gateway* que contenga los sitios *attR1* y *attR2*.

#### 1.2 Obtención de los vectores de transformación pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ y pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ .

El vector de transformación se sintetizó utilizando el vector puc18 (2616 pb). Los distintos fragmentos que componen el vector de transformación pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  se fueron introduciendo uno a uno en el sitio de clonación múltiple del vector puc18. El fragmento Nost (272 pb) se extrajo del vector pANDA- $\beta$  mediante restricción con la enzima EcoRI y se introdujo en el puc18, dando lugar al puc18\_Nost. Seguidamente se extrajo el fragmento *attR*sense\_GUS\_ *attR*antisense (4,4 kb) del vector pANDA mediante la restricción combinada con las enzimas SacI y KpnI y se introdujo en el vector puc18\_Nost dando lugar al puc18\_ *attR*\_GUS\_Nost. Este fragmento contenía los sitios *attR1* y *attR2* en sentido y antisentido separados por una secuencia de unión de 1 kb (enlazador gus). Esta secuencia de enlazador gus fue sustituida por el fragmento de intrón Ubi (1019 pb), previamente clonado en nuestro laboratorio, mediante restricción con la enzima EcoRV dando lugar al plásmido puc18\_ *attR*\_Ubi\_Nost. Finalmente el promotor de gliadinas (885 pb) fue introducido mediante restricción doble con las enzimas SphI y XhoI dando lugar al plásmido puc18\_Gli\_ *attR*\_Ubi\_Nost.

El promotor del gen D-hordeína (836 pb) fue introducido también mediante restricción doble con las enzimas SphI y XhoI dando lugar al vector puc18\_D\_ *attR*\_Ubi\_Nost. La diferencia entre los vectores pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  y pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  es que el primero contiene el promotor de  $\gamma$ -gliadinas de trigo y el segundo contiene el promotor de H-hordeína de trigo.

El siguiente paso fue la introducción del fragmento  $\omega/\alpha/\beta$  en los plásmidos puc18\_Gli\_ *attR*\_Ubi\_Nost y puc18\_D\_ *attR*\_Ubi\_Nost. El plásmido TOPO+  $\omega/\alpha/\beta$  contenía los sitios *attL1* y *attL2* mientras que los plásmidos

puc18\_Gli\_attR\_Ubi\_NOST y puc18\_D\_attR\_Ubi\_Nost contenían los sitios *attR1* y *attR2* en sentido y antisentido separados por el intrón Ubi. Esto permitió realizar una reacción de recombinación LR utilizando el kit *Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado fue la introducción del fragmento  $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  en sentido y en antisentido separados por el intrón Ubi y dentro de la estructura de los plásmidos puc18\_Gli\_attR\_Ubi\_NOST y puc18\_D\_attR\_Ubi\_Nost. Los vectores resultantes se denominaron pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  y pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  (FIG. 2) y fueron introducidos mediante transformación en células competentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) para su posterior multiplicación.

## Ejemplo 2. Obtención de líneas transgénicas de trigo.

La transformación genética se llevó a cabo mediante biolística, utilizando el sistema de aceleración de las partículas mediante presión de helio (PDS1000/He<sup>TM</sup>, BIORAD, Hercules, CA). Se utilizaron dos genotipos de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) cultivar Bobwhite (BW208 y BW2003) y uno de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*) cultivar Don Pedro para el aislamiento de escutelos de embriones inmaduros. El aislamiento se llevó a cabo en un ambiente de esterilidad a partir de granos de trigo inmaduros recogidos 12-16 días después de la antesis, previamente esterilizados mediante inmersión durante 3 min en una solución de etanol 70 %, 10 min en una solución de hipoclorito sódico 20 % y dos enjuagues con H<sub>2</sub>O destilada estéril. Para la transformación genética se utilizaron partículas de oro de 0,6  $\mu$ m de diámetro y se mezclaron 1,5 pmoles/mg oro del vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  o del vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  y 0,5 pmoles/mg oro del vector pAHC25 (Christensen *et al.*, 1996. *Transgenic Research* 5, 213-218). Las condiciones de cada disparo fueron: 91,4 KPa (27 pulgadas Hg) de presión de vacío 7,584 MPa (1100 PSI) de presión de disparo, 6 cm de distancia de disparo, 60  $\mu$ g de la mezcla de oro y plásmidos por disparo.

La cotransformación con el plásmido pAHC25 que contiene el gen *bar* de selección (resistencia a fosfonotricina) y el gen *uidA* (síntesis de  $\beta$ -glucuronidasa) permitió la selección de los tejidos transformados en medios con 4mg/l de fosfinotricina (PPT) y la posterior identificación de los transgénicos mediante el ensayo de la  $\beta$  glucuronidasa (GUS) de acuerdo al protocolo descrito por Jefferson (1987, *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405). Los medios, el proceso de cultivo *in vitro* y la regeneración de plantas se llevó a cabo según Barro *et al* (Barro *et al.*, 1998. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 684-695).

Las plantas regeneradas en cultivo *in vitro* se sembraron en tierra y se les realizó el ensayo GUS como tal y como se describe en el párrafo anterior. A las plantas que dieron un resultado positivo en el ensayo GUS se les extrajo ADN utilizando reactivo *DNAzol* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó una PCR para confirmar la presencia de los plásmidos pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ , pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  y pAHC25 en el genoma de la planta adulta. Las condiciones de PCR fueron: 100 ng de ADN extraído de hojas jóvenes, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 1x tampón y 0,625 unidades de polimerasa *Tth* (BIOTOOLS, Madrid, España). Los cebadores utilizados fueron prGliF (SEC ID N° 14) y Omega\_III\_R solapante (SEC ID N° 12) para el plásmido pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ , prHorDF (SEC ID N° 15) y Omega\_III\_R solapante (SEC ID N° 12) para el plásmido pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$  y BAR\_F (SEC ID N° 16) y BAR\_R (SEC ID N° 17) para el pAHC25 (Tabla 3). Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94 °C 5 min, 35 ciclos de 94 °C 30 seg, 55 °C 30 seg y 72 °C 2 min; y una extensión final de 72 °C 7 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems). El producto de cada PCR se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 % y las líneas positivas se seleccionaron para su posterior análisis.

Tabla 3. Cebadores y secuencias utilizados.

cebador	secuencia 5' a 3'
Alpha_hp_F	(SEC ID N° 8)
Alpha_hp_R	(SEC ID N° 9)
Omega_III_F	(SEC ID N° 10)
Omega_III_R	(SEC ID N° 11)
Omega_III_R solapante	(SEC ID N° 12)
Alpha_F_solapante	(SEC ID N° 13)
prGli_F	(SEC ID N° 14)
prHorDF	(SEC ID N° 15)
BAR_F	(SEC ID N° 16)
BAR_R	(SEC ID N° 17)

## Ejemplo 2. Extracción de gliadinas y análisis MALDI/TOF y A-PAGE.

Las semillas de las líneas positivas se machacaron en un mortero hasta obtener harina. A continuación la harina se lavó con 1 ml de una solución de 0,5 M de NaCl durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) en un agitador y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con agua destilada durante 15 min a TA también en agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min, desechándose el sobrenadante. Las gliadinas se extrajeron del precipitado con una solución acuosa de etanol al 60 % (v/v) en una relación 5:1 ( $\mu$ l etanol:mg harina) y agitación durante 45 min a TA. Posteriormente las

muestras se centrifugaron a 13.000 rpm y el sobrenadante que contenía las gliadinas se recogió en tubos nuevos. Una fracción del extracto se utilizó para identificación de gliadinas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y otra fracción se separó por electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida (A-PAGE). Para el análisis MALDI, a 5 µl del extracto de gliadinas se le añadió 2 µl de una solución 50 mM octil-β-D-glucopiranosido (ODGP) y 25 µl de ácido sinapínico saturado en una solución acuosa al 30 % (v/v) de acetonitrilo que contenía 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) que se usa como solución matriz. La mezcla se secó en una centrifugadora *Speed-Vac* durante 15 min y el residuo se disolvió en 6 µl de una solución acuosa de etanol al 60 % (v/v) que contenía TFA al 0,1 %. La mezcla se colocó en un portamuestras de acero inoxidable y se dejó secar durante 5 min a TA. Las muestras se analizaron en un MALDI-TOF *Voyager DE-PRO* (*PE Biosystems*) en la configuración estándar del instrumento. Los espectros se registraron en el modo lineal positivo a una aceleración de voltaje de 25 kV con una rejilla de voltaje del 93 % y 700 nanosegundos de retardo. Se acumularon 200 espectros del láser para construir los perfiles de gliadinas.

Las gliadinas se separaron en geles A-PAGE siguiendo los protocolos estándares descritos por (Khan *et al.*, 1985. *Cereal Chemistry* 62: 310-313).

Se llevó a cabo la hibridación (transferencia de Western) de las gliadinas separadas en los geles SDS-PAGE con el anticuerpo R5 (Valdez *et al.* 2003, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:465-474), ya que éste es el método oficial reconocido por el Codex Alimentarius para la detección de gluten en alimentos

Los análisis en geles A-PAGE y MALDI-TOF mostraron que la combinación de esta secuencia híbrida es altamente eficaz en el silenciamiento de gliadinas de trigo.

En la FIG. 3 se muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas del cultivar de trigo BW208, transformadas con el polinucleótido de la invención, por medio de las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF. En la FIG. 3A se observa la atenuación de las bandas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas procedente de semillas de una línea de trigo harinero transformada con el vector pGhp-ω/α/β/γ (B377-2-3) cuando se compara con el cultivar BW208 de trigo control de la que procede (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*). En la FIG. 3B se observa el perfil de expresión del espectro que corresponde con las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas, donde cada uno de los picos corresponde con una proteína diferente. En la gráfica se señalan los picos que corresponden con cada uno de los tipos de gliadina. Tal como se observa en los perfiles de expresión correspondiente a plantas control y en los perfiles de expresión de las plantas transformadas con el polinucleótido de la invención, la supresión de los picos correspondientes a cada una de las gliadinas que se observan en el perfil de las plantas control, es muy notoria, demostrándose de este modo la eficacia del polinucleótido y del método de la presente invención en el silenciamiento post-transcripcional de las gliadinas presentes en los granos de trigo pertenecientes a este cultivar.

En las FIG. 4 y 5 se muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas del cultivar de trigo BW2003 (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) y de la variedad Don Pedro (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) respectivamente, transformadas con el polinucleótido de la invención, por medio de la técnica A-PAGE. En ambos casos se observa la atenuación de las bandas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas procedente de las semillas de las líneas de trigo transformadas con el vector pGhp-ω/α/β/γ (B377-2-3) cuando se compara con sus respectivos controles.

En la FIG. 6 se muestra la separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea control BW208 y tres semillas de una línea (B382-4-1) del mismo genotipo transformada con el vector pDhp-ω/α/β/γ. El promotor que contiene este vector es el promotor de un gen D-Hordeína (SEC ID N° 7). Se observa la atenuación de las bandas en las semillas de las líneas transgénicas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas de trigo.

En la FIG. 7 se muestra el análisis por transferencia de Western de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) transformadas con el vector pDhp-ω/α/β/γ que contiene el promotor codificado por la secuencia SEC ID N° 7.

En el gel A se muestra la separación de gliadinas en geles SDS-PAGE de tres granos de trigo (I1, I2 e I3) de la línea transgénica B382-4-1. En el gel B se muestra la separación de gliadinas de dos granos de trigo (O2 y O3) de la línea transgénica B374-6-2. Posteriormente ambos geles se han hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 que reconoce péptidos que son potencialmente tóxicos para los celíacos. El anticuerpo monoclonal R5 es el método oficial reconocido por el Codex Alimentarius para la detección de gluten en alimentos.

En la FIG. 7A no se observa un nivel apreciable de gliadinas en las líneas de trigo BW208 que expresan el péptido de la invención, atendiendo a este tipo de detección con el anticuerpo R5. En la FIG. 7B se observa una considerable reducción de gliadinas en esta otra variedad BW2003 transgénica de trigo.

En la FIG. 8 se observa en un gel SDS-PAGE la atenuación de las gliadinas de tres granos de la línea transgénica B375-3-1, denotados como A1, A2, A3 y las gliadinas de dos granos de trigo de la línea transgénica B377-2-3, ambas del genotipo BW208 cuando se hibridan con los anticuerpos específicos de gluten R5. Las líneas transgénicas contienen el promotor de γ-gliadinas, es decir, se transformaron con el vector pGhp-ω/α/β/γ.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Barro Losada, Francisco Piston Piston, Fernando Gil, Javier Gil Humanes, Javier Martin Munoz, Antonio

5 <120> Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante RNAi.

<130> U2149-00301

10 <140> 13/147,151 <141> 26-01-2010

<150> P200900302 <151> 03-02-2009 <160> 17

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 191  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia en sentido de gliadinas omega

25 <400> 1

```

    ccttcctcat ctttgctctc cttgccatgg cgatgaagat cgccactgcc gctagggagt      60
    taaaccctag caacaaagag ttacaatcac ctcaacaatc attttcccat caacaacaac      120
    catttcaca gcagccatat ccacaacaac catatccatc acagcaacca tatccatcgc      180
    aacaaccatt t                                                                191
    
```

<210>2  
 <211> 170  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia en sentido de gliadinas alfa, beta, gamma

35 <400> 2

```

    caacaacaac tgattccatg cagggatggt gtattgcaac aacacagcat agcgtatgga      60
    agctcacaag ttttgcaaca aagtacttac cagctggtgc aacaattgtg ttgtcagcag      120
    ctgtggcaga tccccgagca gtcgcggtgc caggccatcc acaatggtat                  170
    
```

40 <210>3  
 <211> 170  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia en antisentido de gliadinas alfa, beta, gamma

<400> 3

50

```

    ataacattgt ggatggcctg gcaccgagac tgctcgggga tctgccacag ctgctgacaa      60
    cacaattggt gcaccagctg gtaagtactt tgttgcaaaa cttgtgagct tccatacgct      120
    atgctgtggt gttgcaatac aacatccctg catggaatca gttgttggtg                  170
    
```

ES 2 534 939 T3

5 <210>4  
 <211> 191  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia en antisentido de gliadinas omega

10 <400> 4

aaatggttgt	tgcatggat	atggttgctg	tgatggatat	ggttggttg	gatatggctg	60
ctgtggaaat	ggttggttgt	gatgggaaaa	tgattggtga	ggtgattgta	actctttggt	120
gctaggggtt	aactccctag	cggcagtggc	gatcttcac	gccatggcaa	ggaggacaaa	180
gatgaggaag	g					191

15 <210>5  
 <211> 1011  
 <212> ADN  
 <213> *Zea mays*

<400> 5

gttcaaggta	cgccgctcgt	cctccccccc	ccccctctc	taccttctct	agatcggcgt	60
tccggtecat	ggttagggcc	cggtagtctt	acttctgttc	atgtttgtgt	tagatccgtg	120
tttgtgttag	atccgtgctg	ctagcgttcg	tacacggatg	cgacctgtac	gtcagacacg	180
ttctgattgc	taacttgcca	gtgtttctct	ttggggaatc	ctgggatggc	tctagccggt	240
ccgcagacgg	gatcgatttc	atgatttttt	ttgtttcggt	gcataggggt	tggtttgccc	300
ttttccttta	tttcaatata	tgccgtgcac	ttgtttgtcg	ggtcactctt	tcatgctttt	360
ttttgtcttg	ggtgtgatga	tgtggctcgg	ttgggcggtc	gttctagatc	ggagtagaat	420
tctgtttcaa	actacctggt	ggatttatta	attttggatc	tgtatgtgtg	tgccatacat	480
attcatagtt	acgaattgaa	gatgatggat	ggaaatatcg	atctaggata	ggtatacatg	540
ttgatgcggg	ttttactgat	gcatatacag	agatgctttt	tgttcgtctg	gttgtgatga	600
tgtggtgtgg	ttgggcggtc	gttcattcgt	tctagatcgg	agtagaatac	tgtttcaaac	660
tacctggtgt	atattattaat	tttggaaactg	tatgtgtgtg	tcatacatct	tcatagttac	720
gagtttaaga	tggatggaaa	tatcgatcta	ggataggtat	acatgttgat	gtgggtttta	780
ctgatgcata	tacatgatgg	catatgcagc	atctattcat	atgctctaac	cttgagtacc	840
tatctattat	aataaacaag	tatgttttat	aattattttg	atcttgatat	acttggatga	900
tggcatatgc	agcagctata	tgtggatttt	tttagccctg	ccttcatacg	ctatttattt	960
gcttggtact	gtttcttttg	tcgatgctca	ccctggtgtt	tggtgttact	t	1011

25 <210>6  
 <211> 885  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*

<400>6

ES 2 534 939 T3

ttccagaaaa aactttgcta atgtatgaca gttatgtagt gaatattttc aacctaagga 60  
 acatttttaa tttatTTTTT ataaaattat aattcgactt ggcattcgaa tttggatttg 120  
 agttttggtt tgaaacggaa agaggattag taaaatgatt atgatgacat agcatcatta 180  
 ggcattgagat tactgtagca tgacatgggg gtgttacct tgtacaatat tcctaccctt 240  
 gacataaaag gagaatttga tgagtcattg attgataacg tataacaacat tactaccctt 300  
 gacataaaag gagaatttga tgagtcattg attgataaca tgtacaagat tactatcagc 360  
 ttgttcatct taccatcata ttatacaaca ctacaagtta gttttagaaa gaacaagagt 420  
 ccacaacaaa tadcagaata cttgcctgat ctatctaac aacatgcaca aggacacaaa 480  
 tttagtcccc cgcaagctat gaagatttgg tttatgtcta acaacttgta cagatccaaa 540  
 aggaatgcaa tccagataat tgtttgacat gtaaagttaa taagatgagt caatgccaat 600  
 tatcaagtat tcctcactct tagatgatat gtacaataaa aagacaactt tgatgatcac 660  
 tctgaaatta cgtttgtatg tagtgccacc aacacaaca taccaaataa ttagtttgat 720  
 aagcatcaaa tcacttttaa aaaagaaagc aataatgaaa agaaaccta ccatggttagc 780  
 yataaaaagg cctacaatat gtagactcca taccatcatc catcgttcac acaactagag 840  
 cacaagcaga aatcaaagt acgtagttagt taacgcaaat ccacc 885

<210>7  
 <211> 836  
 <212> ADN  
 <213> *Hordeum chilense*

5

<400>7  
 ccattaattg aactcattcg ggaagcggga aaatttccaa ttctggtata aatcaaacta 60  
 ttigacgcga attttctctg aagatcatat gttatTTTTT gacatcactg accaaagggt 120  
 tcagttgggt gagttttgtc acggatacaa gatgcttcca tacgtcaaaa aattctacca 180  
 acttttggtg cggtgcctcg tagcacggat agatcttgtg tgtcactgga tagatgittg 240  
 gtgtcactag attgatattg tgagtcattg catggatttg tgttgccctg aaaggggaatt 300  
 acatgacaag caacaaaacc tgaaatgagc ttttggaag atgatttatc agtttacttg 360  
 ttccatgcaa gctaccttcc actactcgac atgcttagaa gcttcgagtg cccgcggatt 420  
 tgccaaagca atggctaaca gacacatatt ctgccaaaaa cccagaacga taatcgcttc 480  
 tcgtagatga agagaacaga ccaagataca aacgtccaca cttctgcaa cagtacccca 540  
 gaactaggat taagccgatt acgtggcttt agcagaccgt ccaaaaaaac tgctttgcaa 600  
 agtccaatt cctccttget tatccaattt cttttgtggt ggcaactgc actttttcca 660  
 accgattctg ttcttcccgt gtttcttctt aggctagcta acatagccgt gcacacagcc 720  
 atggtccgga accttcaact cgtccctata aaagcccagc caatctccac aatctcttca 780  
 tcaccgagaa caccgrgcac caccgaaacta gagatcaatt cattgacagt cggatg 836

10

ES 2 534 939 T3

<210>8  
 <211>21  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 5  
 <400>8  
 caacaacaac tgattccatg c 21  
 <210>9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 10  
 <400> 9  
 ayracattrt ggatggcytg 20  
 <210> 10  
 <211>21  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 20  
 <400> 10  
 ccttctcat cttgtcctc c 21  
 <210> 11  
 <211>21  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 25  
 <400> 11  
 aaatggtgt tgcgatggat a 21  
 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 35  
 <400> 12  
 cagtgtgtg tgaaatggt gttgcgatgg 30  
 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 40  
 <400> 13  
 caacaaccat tcaacaaca actgattcca 30  
 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Triticum sp.*  
 50  
 <400> 14  
 ttccagaaaa aacttgcta atg 23  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Hordeum chilense*  
 60  
 <400> 15  
 ccattaattg aactcattcg 20  
 <210> 16  
 <211> 19

<212> ADN  
<213> *Streptomyces hygroscopicus*

5 <400> 16  
gtctgcacca tcgtcaacc 19

10 <210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> *Streptomyces hygroscopicus*

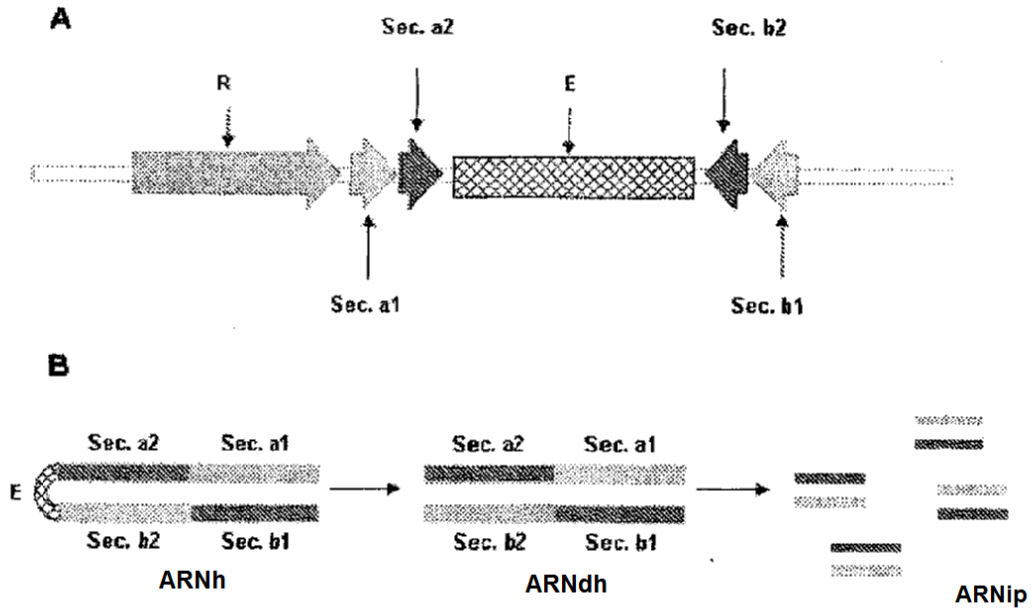
<400> 17  
gaagtcagc tgccagaaac 20



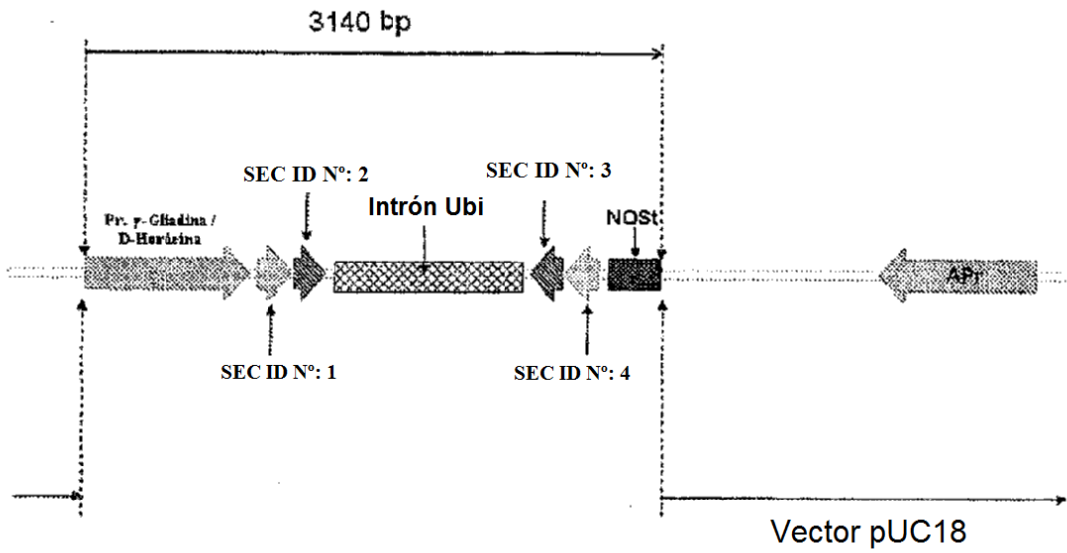
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora en el que:
- a. las secuencias a1, a2, b1 y b2 son diferentes entre sí y se seleccionan entre SEC ID Nº 1, SEC ID Nº 2, SEC ID Nº 3 o SEC ID Nº 4, de la siguiente forma:
  - b. si a1 es SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 4, b1 es SEC ID Nº 4 o SEC ID Nº 1 y a2 es SEC ID Nº 2 o SEC ID Nº 3, y
  - c. si a1 es SEC ID Nº 2 o SEC ID Nº 3, b1 es SEC ID Nº 3 o SEC ID Nº 2 y a2 es SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 4.
- 10 2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en que a1 es SEC ID Nº 1, a2 es SEC ID Nº 2, b2 es SEC ID Nº 3 y b1 es SEC ID Nº 4.
- 15 3. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en que la secuencia espaciadora es SEC ID Nº 5.
4. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende una secuencia reguladora de la expresión génica unida funcionalmente a su extremo 5'.
- 20 5. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que la secuencia reguladora de la expresión génica es SEC ID Nº 6 y/o SEC ID Nº 7.
- 25 6. Una secuencia de ARN codificada por el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, capaz de formar un ARNh en que la secuencia codificada por el par a1-a2 hibrida completamente con la secuencia codificada por el par b2-b1.
7. Un ARNip generado a partir de la secuencia del ARNh de acuerdo con la reivindicación 7.
- 30 8. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Una célula aislada transfectada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
- 35 10. Una planta modificada genéticamente en donde dicha planta comprende la célula transfectada de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una planta modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el polinucleótido está integrado en una forma estable.
- 40 12. La planta de acuerdo la reivindicación 11, en donde dicha planta pertenece al género *Triticum*.
13. La planta de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha planta se selecciona entre las especies *Triticum aestivum* o *Triticum turgidum*.
- 45 14. La planta de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha planta es un cultivar Bobwhite o un cultivar Don Pedro.
15. Una semilla derivada de la planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde dicha semilla comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 50 16. El polen, el propágulo, la progenie o parte de la planta derivada de cualquiera de las plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde dichos polen, propágulo, progenie o parte comprenden el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 55 17. El uso del polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un vector de acuerdo con la reivindicación 9 o célula de acuerdo con la reivindicación 10 para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.
18. El uso de la semilla de acuerdo con la reivindicación 15 para la preparación de harina, una composición alimenticia, una vitamina o un suplemento nutricional.
- 60 19. Una composición alimenticia preparada a partir de la semilla de acuerdo con la reivindicación 15.
20. Un método para la obtención de la planta modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende lo siguiente:
- 65 a. seleccionar una parte de la planta,

- b. transfectar las células de la parte de la planta del apartado (a) con el vector de acuerdo con la reivindicación 9,  
c. seleccionar la célula transfectada del apartado (b) que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,  
d. regenerar al menos una planta procedente de la célula seleccionada en el apartado (c),  
5 e. seleccionar una o varias plantas regeneradas de acuerdo con el apartado (d) en las que el polinucleótido se transcribe en un ARN<sub>h</sub>,  
f. seleccionar una o más plantas obtenidas de acuerdo con el apartado (e) que presentan silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.
- 10 21. Un método para producir una composición alimenticia con contenido reducido de gliadina que comprende producir una planta transgénica de trigo con contenido reducido de gliadina que comprende integrar el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el genoma de una planta y silenciar las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en las semillas de dicha planta, producir semillas a partir de dicha planta en que las alfa, beta, gamma y omega gliadinas están silenciadas y preparar una composición alimenticia a partir de dichas semillas.
- 15 22. Una secuencia de ácido nucleico aislada correspondiente al promotor del gen para gamma gliadinas definido en SEC ID N° 6.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

A

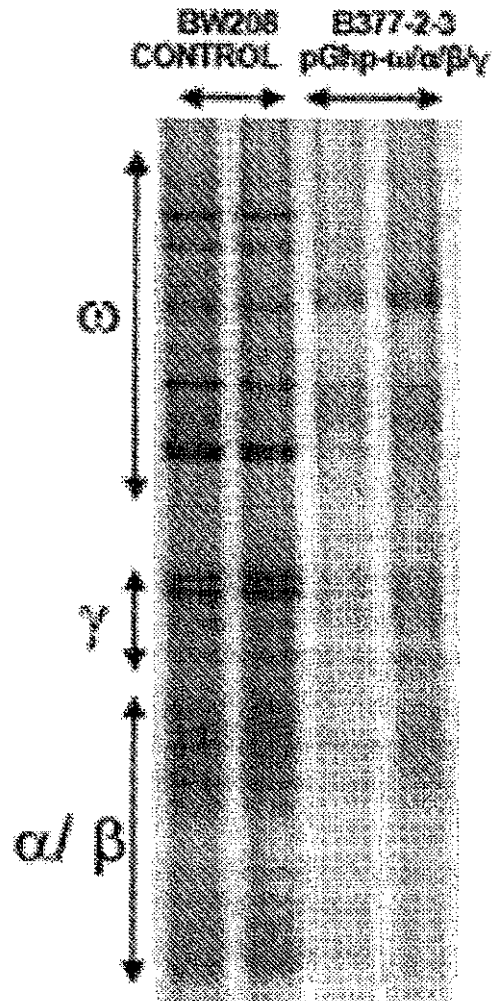


FIG. 3

B

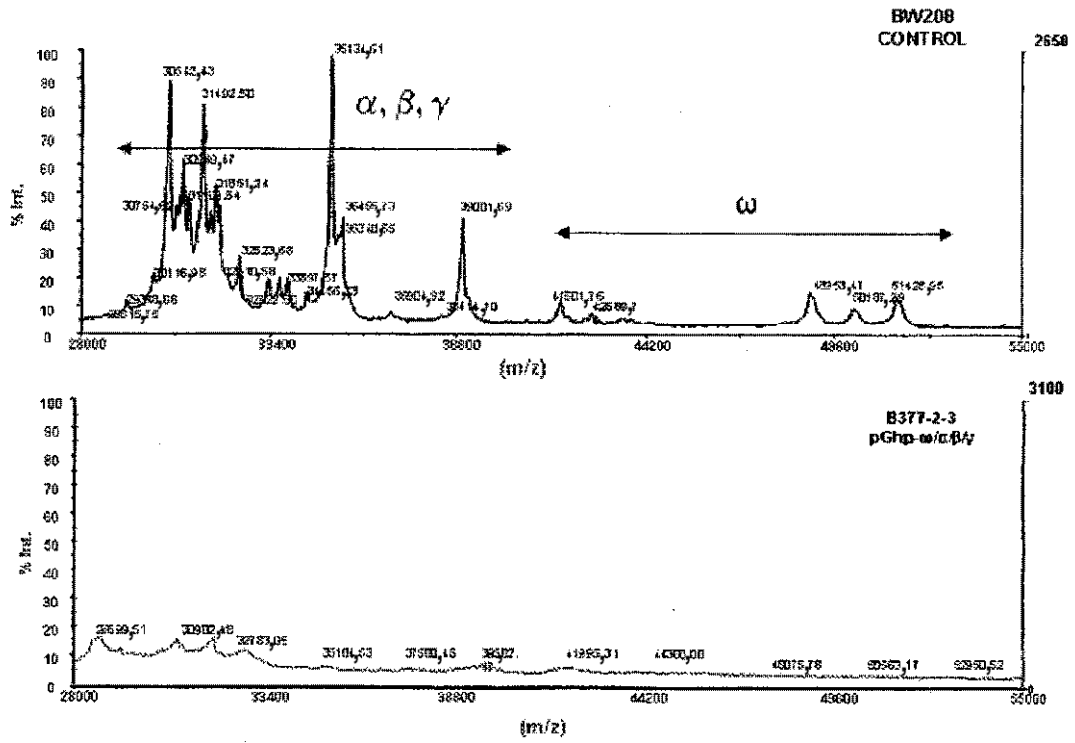


FIG. 3 (Cont.)

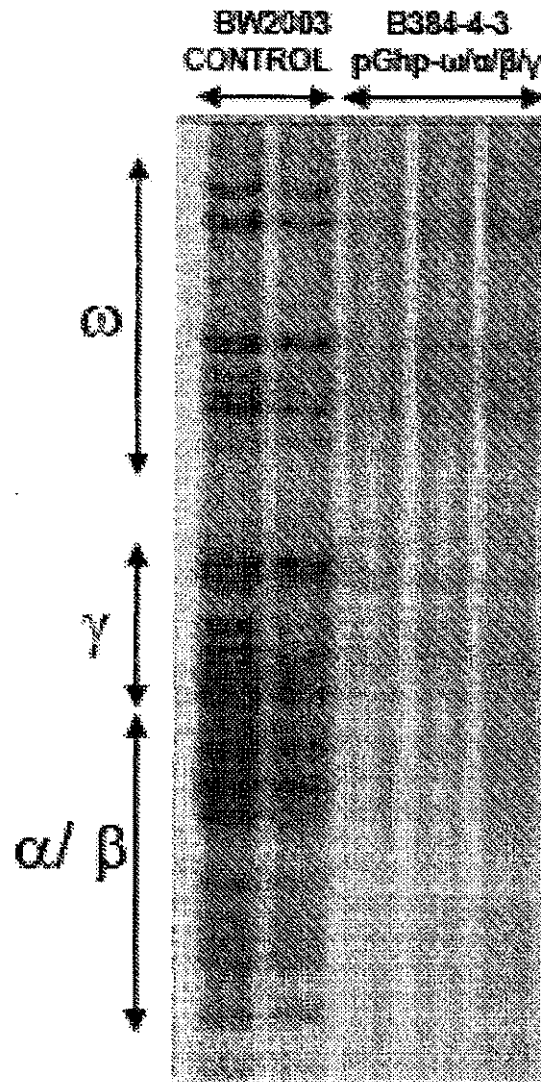


FIG. 4

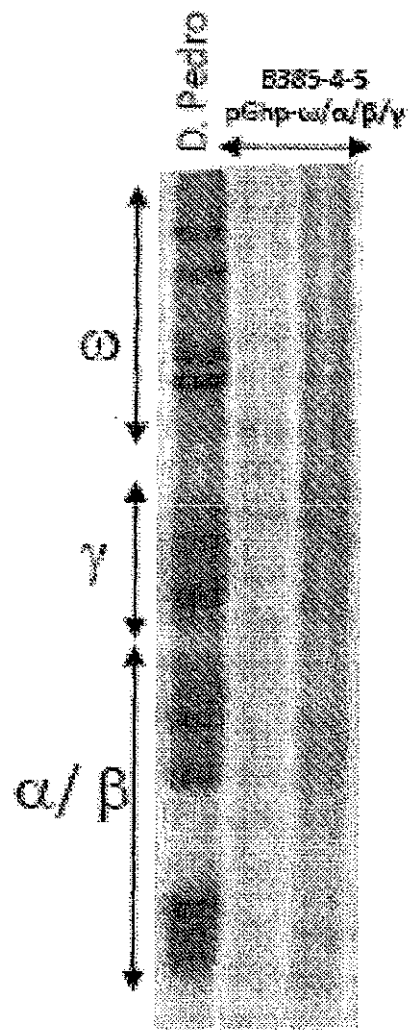


FIG. 5

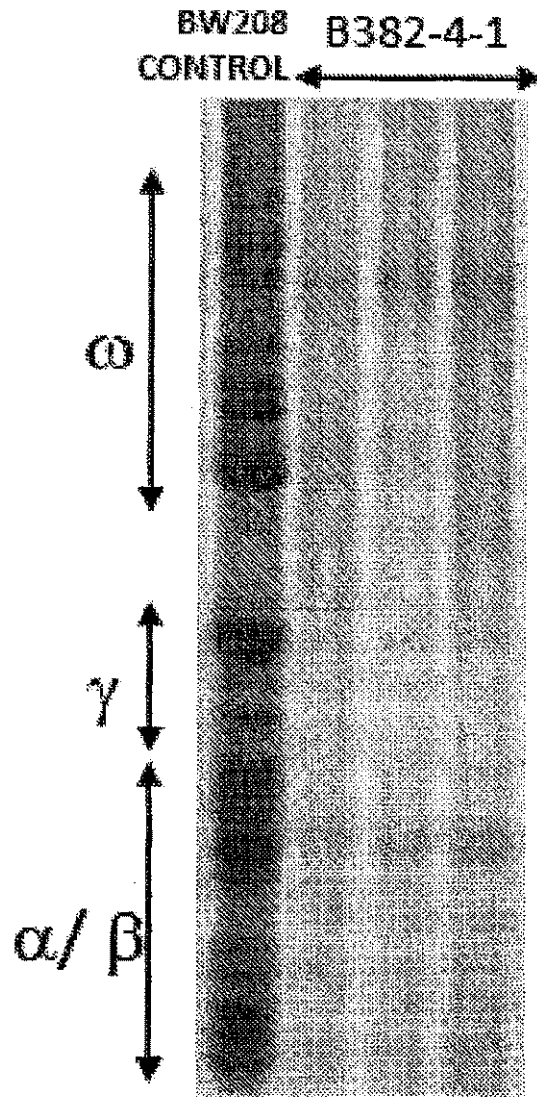
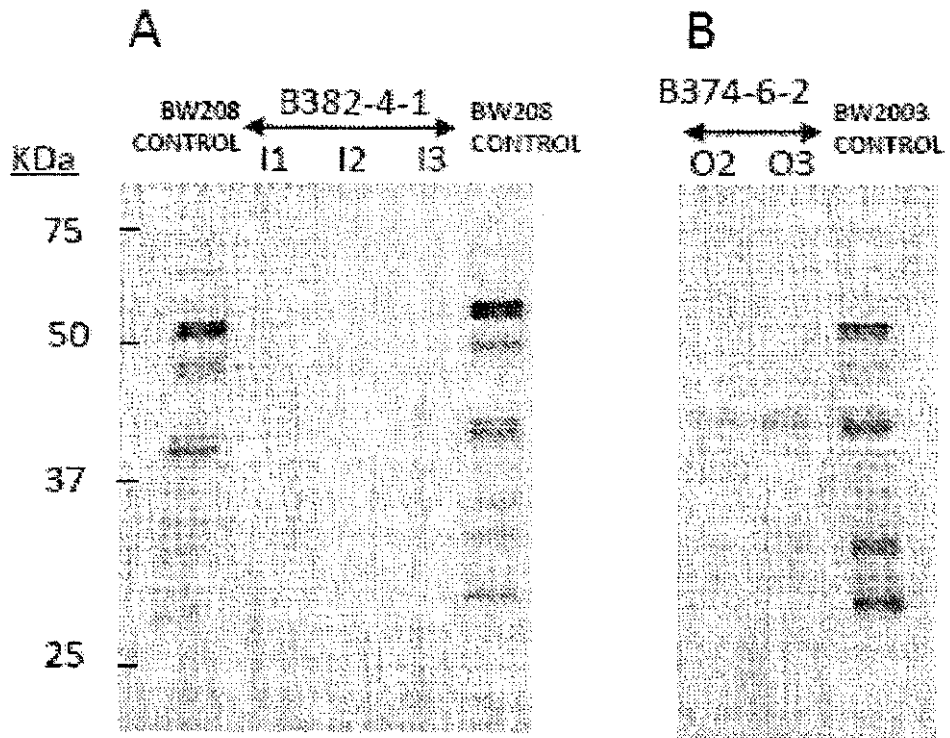


FIG. 6





**FIG. 7**

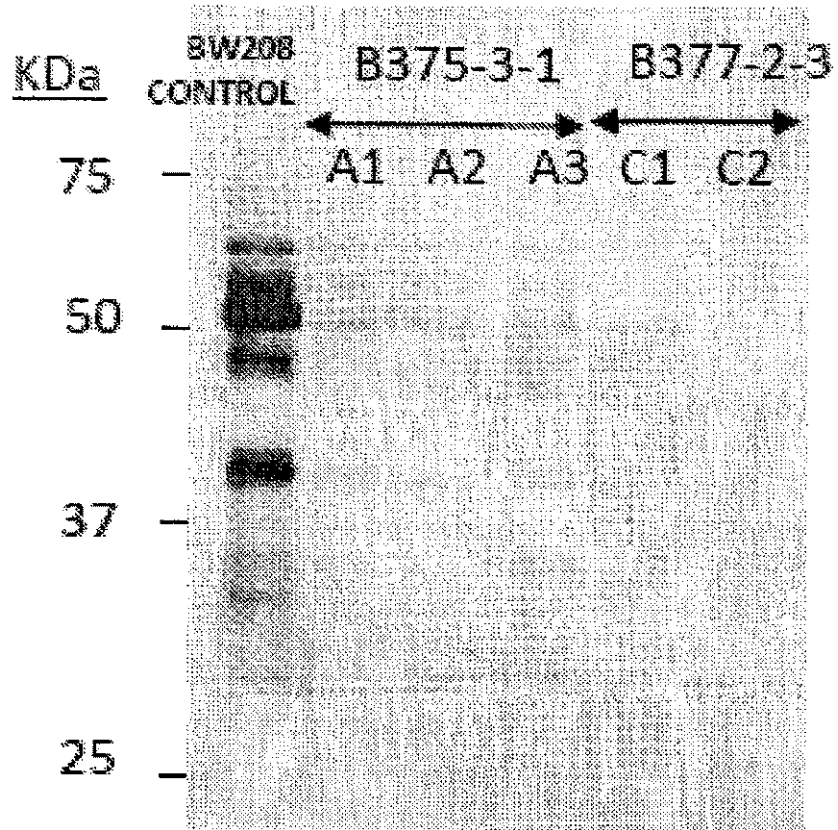


FIG. 8