

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 907**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A24B 15/18** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2006** **E 11187201 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015** **EP 2450446**

54 Título: **Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.08.2015**

73 Titular/es:

**22ND CENTURY LIMITED, LLC (100.0%)**  
**9530 Main Street**  
**Clarence, NY 14031, US**

72 Inventor/es:

**HASHIMOTO, TAKASHI y**  
**KAJIKAWA, M.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 543 907 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

Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y la regulación de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por lo tanto, la invención se refiere, por ejemplo, a metodología y construcciones para aumentar el nivel de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana* y a células que se manipulan por ingeniería genética para producir alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados, cuando de otro modo no los producirían.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** Actualmente se conocen varias enzimas de la biosíntesis de nicotina. Por ejemplo, se ha clonado el gen de la quinolato-fosforribosiltransferasa de tabaco (*QPT*), véanse la patente de los EE. UU. n° 6.423.520 y Sinclair y col., *Plant Mol. Biol.* 44: 603-17 (2000), y su supresión proporciona reducciones significativas de nicotina en plantas transgénicas de tabaco. Xie y col., *Recent Advances in Tobacco Science* 30: 17-37 (2004). Igualmente, se ha observado que la supresión de una secuencia endógena de putrescina-metiltransferasa (*PMT*) reduce los niveles de nicotina pero aumenta los niveles de anatabina de dos a seis veces. Hibi y col., *Plant Cell* 6: 723-35 (1994); Chintapakorn y Hamill, *Plant Mol. Biol.* 53: 87-105 (2003); Steppuhn y col., *PLoS Biol.* 2:8:e217: 1074-1080 (2004).

**[0003]** Mientras que los esfuerzos de investigación anteriores se han centrado en el uso de enzimas de la biosíntesis de nicotina para reducir la nicotina en las plantas, muy pocas investigaciones han abordado el papel de las enzimas de la biosíntesis de nicotina en el aumento de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Esta falta de datos de regulación por aumento puede atribuirse al hecho de que la sobreexpresión de un gen conocido de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos, como *PMT* o *QPT*, no tiene necesariamente que aumentar la producción y acumulación de metabolitos secundarios en la planta. Es decir, no necesariamente porque la regulación por disminución de un gen de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos reduzca la producción y acumulación de alcaloides, la sobreexpresión de este mismo gen de biosíntesis de alcaloides nicotínicos va a aumentar la producción y acumulación de alcaloides nicotínicos.

**[0004]** Debido a la escasez de investigación, existe la necesidad de identificar genes que aumenten la biosíntesis y acumulación de la nicotina. Por ejemplo, dado que los alcaloides nicotínicos desempeñan un papel importante en la protección de las plantas contra insectos y herbívoros, probablemente sea ventajoso aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos en una planta huésped. Desde el punto de vista de los herbívoros, el aumento de la síntesis y acumulación de nicotina proporcionará un modo respetuoso con el medio ambiente de intervenir en las interacciones entre planta y plaga.

**[0005]** Desde el punto de vista de la industria tabaquera, en que la nicotina es el componente física y fisiológicamente activo del humo de los cigarrillos, puede ser ventajoso aumentar el contenido de nicotina en el tabaco por ingeniería genética. Los estudios de investigación demuestran que cuando se añade físicamente nicotina adicional al tabaco de los cigarrillos de una fuente externa, los fumadores inhalan menor cantidad de los componentes más dañinos del humo como alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., *Psychopharmacology* 96: 447-53 (1988), Fagerström, *Psychopharmacology* 77: 164-67 (1982), Russell, *Nicotine and Public Health* 15: 265-84 (2000) y Woodman y col., *European Journal of Respiratory Disease* 70: 316-21 (1987). Asimismo, un informe del Instituto de Medicina (IOM) de los EE. UU. sobre productos potenciales de exposición reducida (PREP) concluyó que otra estrategia general para reducir el daño del tabaco es la retención de nicotina a niveles agradables o adictivos mientras se reducen los componentes más tóxicos. Véase CLEARING THE SMOKE, ASSESSING THE SCIENCE BASE FOR TOBACCO HARM REDUCTION, IOM, en la página 29 (2001); publicación a la que la industria del tabaco normalmente hace referencia como "informe del IOM".

**[0006]** Además de las aplicaciones más tradicionales para productos con aumento de nicotina, como cigarrillos y otros productos de tabaco, algunos estudios farmacológicos recientes sugieren un papel terapéutico para la nicotina y compuestos relacionados. Por ejemplo, varios grupos de investigación están estudiando actualmente fármacos que reconocen selectivamente receptores de nicotina como un modo de tratar deficiencias cognitivas como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la pérdida de memoria relacionada con la edad. Singer, "The Upside to Nicotine", *Technology Review* (28 de julio de 2006). Se ha demostrado que ligandos de receptores de acetilcolina, como la nicotina, tienen efectos sobre la atención, la cognición, el apetito, la drogadicción,

la memoria, la actividad extrapiramidal, la actividad cardiovascular, el dolor y la motilidad y actividad gastrointestinal. Patente de los EE. UU. n° 5.852.041. Por lo tanto, existen beneficios terapéuticos de la nicotina y los compuestos relacionados y por lo tanto existe la necesidad de mejores procedimientos para su producción.

- 5 **[0007]** Por consiguiente, existe una necesidad continua de identificar genes adicionales cuya expresión pueda modificarse para aumentar el contenido de alcaloides nicotínicos en las plantas, en particular de nicotina en plantas de *N. tabacum*, así como para producir nicotina y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

### **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

10

**[0008]** Existen cuatro genes, *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*, en los que se puede influir para aumentar los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*, así como para sintetizar alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.

15

**[0009]** En un aspecto, se da a conocer un procedimiento para aumentar los alcaloides nicotínicos, como nicotina, en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de al menos uno de *A622* y *NBB1* con respecto a una planta de control. En una realización, se sobreexpresa *NBB1*. En otra realización, se sobreexpresan *A622* y *NBB1*. En otra realización más, se sobreexpresan *A622* y *NBB1* y al menos uno de *QPT* y *PMT* también se sobreexpresa. Además, se pueden sobreexpresar *QPT* y *A622*.

20

**[0010]** También se describe una planta con aumento de nicotina y productos derivados de la misma, que se produce por cualquier procedimiento de sobreexpresión de uno o más de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. También se dan a conocer productos seleccionados del grupo que consta de un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

25

**[0011]** Se da a conocer un procedimiento para la producción de alcaloides nicotínicos, que comprende la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos. La expresión de *NBB1* y *A622* puede tener lugar en una célula seleccionada del grupo que consta de una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentosos, alga, mamífero o insecto.

30

**[0012]** También se da a conocer una planta con aumento de alcaloides nicotínicos, producida por la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos. También se da a conocer un producto con alcaloides nicotínicos obtenido por la expresión heteróloga de *NBB1* y *A622* en una planta o célula que de otro modo no produce alcaloides nicotínicos.

35

**[0013]** Se da a conocer un procedimiento para la producción comercial de un alcaloide nicotínico que comprende (a) proporcionar una pluralidad de células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide nicotínico de dicha pluralidad.

40

**[0014]** También se da a conocer un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta, que comprende la sobreexpresión de *PMT* y *QPT* con respecto a una planta de control. En esta descripción, se produce una planta con aumento de nicotina. En esta descripción, se produce un producto con aumento de nicotina.

45

**[0015]** Se da a conocer un procedimiento para la producción de la enzima *NBB1* que comprende la transformación de una célula con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y el cultivo de la célula transformada en condiciones en las que se produce la enzima *NBB1*. Las células transformadas pueden seleccionarse del grupo que consta de células bacterianas, de levadura, hongos filamentosos, algas, plantas verdes y mamíferos.

50

**[0016]** Se da a conocer un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende a) el cruzamiento de una planta de *Nicotiana* con aumento de nicotina con una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento; y b) la selección de una planta de *Nicotiana* de la descendencia con aumento de nicotina y del rendimiento. En esta descripción, se produce una planta con aumento de nicotina y del rendimiento.

55

**[0017]** También se da a conocer una planta con aumento de nicotina producida por: a) transformación de una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; b) regeneración de plantas transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y c) selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de nicotina con respecto a una planta de control. El ácido nucleico se puede

seleccionar del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

**[0018]** También se da a conocer un procedimiento para aumentar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana* que comprende: (a) la transformación de una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que aumenta el rendimiento; (b) la regeneración de plantas transgénicas de *Nicotiana* a partir de la planta transformada; y (c) la selección de una planta transgénica de *Nicotiana* con un aumento del contenido de nicotina y un aumento del rendimiento con respecto a una planta de control.

**[0019]** En una realización, la primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica la enzima *NBB1* y se sobreexpresa el gen *NBB1*. También se da a conocer una enzima selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*. En otra realización, se produce una planta con aumento de nicotina y del rendimiento.

**[0020]** Se da a conocer un procedimiento para aumentar la nicotina en *N. tabacum* que comprende la sobreexpresión de *PMT* con respecto a una planta de control.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

20

**[0021]**

**FIGURA 1:** análisis de transferencia de ARN de la expresión de *NBB1*

25 **FIGURA 2:** alineamiento de *NBB1* con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (*EcBBE*)

**FIGURA 3:** árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido *NBB1* y proteínas de plantas similares a *BBE*

30 **FIGURA 4A:** región de ADN-T de *pTobRD2-DEST*

**FIGURA 4B:** región de ADN-T de *pTobRD2-NBB1ox*

**FIGURA 4C:** región de ADN-T de *pTobRD2-A622ox*

35

**FIGURA 4D:** región de ADN-T de *pTobRD2-A622ox-NBB1ox*

**FIGURA 4E:** región de ADN-T de *pBI101H-E2113-DEST*

40 **FIGURA 4F:** región de ADN-T de *pE12355SΩ-NBB1*

**FIGURA 5A:** análisis de inmunotransferencia de *NBB1* en raíces capilares de tabaco

**FIGURA 5B:** análisis de inmunotransferencia de *A622* en raíces capilares de tabaco

45

**FIGURA 6:** contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de *TobRD2-NBB1* (TN), *TobRD2-A622* (TA) y *TobRD2-NBB1-A622* (TNA)

**FIGURA 7:** expresión de la proteína *A622* en plantas transgénicas de *A. belladonna*

50

**FIGURA 8:** plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan *NBB1* y *A622*

**FIGURA 9:** síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan *NBB1* y *A622*

55 **FIGURA 10:** perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan *NBB1* y *A622*

**FIGURA 11A:** región de ADN-T de *pA622pro-DEST*

**FIGURA 11B:** región de ADN-T de pA622pro-PMTox

**FIGURE 11C:** región de ADN-T de pTobRD2-PMTox

5 **FIGURE 11D:** región de ADN-T de pA622pro-QPTox

**FIGURE 11E:** región de ADN-T de pTobRD2-QPTox

**FIGURE 11F:** región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox

10 **FIGURA 11G:** región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox

**FIGURA 12:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

15 **FIGURA 13:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

**FIGURA 14:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS

20 **FIGURA 15:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

25 **FIGURA 16:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS

**FIGURA 17:** contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS

30 **FIGURA 18A:** región de ADN-T de pGWB2

**FIGURA 18B:** región de ADN-T de p35S-NBB1

35 **FIGURA 18C:** región de ADN-T de p35S-NBB1

**FIGURA 19:** análisis de inmunotransferencia de líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT

40 **FIGURA 20:** plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT

**FIGURA 21A:** confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en báculos recombinantes

**FIGURA 21B:** detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos y eluatos de columnas de Ni-NTA

45 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

[0022] La presente descripción se refiere al aumento de los alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*, así como a la producción de alcaloides nicotínicos en células que de otro modo no los producirían. Según se describe a continuación, los presentes inventores se dieron cuenta de que podía influirse en cuatro genes, A622, NBB1, QPT y PMT, para conseguir un aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos en plantas de *Nicotiana*. Es decir, la sobreexpresión de A622 aumenta los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Es posible obtener mayores aumentos de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la simultánea sobreexpresión de al menos otros dos de los cuatro genes, como QPT y PMT.

55 [0023] A622 y NBB1 pueden introducirse en plantas o células no productoras de nicotina para conseguir así que produzcan nicotina o compuestos relacionados.

[0024] Además de proporcionar una metodología para aumentar los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*, la

invención proporciona también el aumento simultáneo de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*. El aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento puede conseguirse mediante una combinación de técnicas de ingeniería genética y mejora convencional.

- 5 **[0025]** Todos los términos técnicos empleados en esta memoria descriptiva son de uso común en bioquímica, biología molecular y agricultura: por consiguiente, son entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Estos términos técnicos pueden encontrarse, por ejemplo, en: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª edición, vols. 1-3, ed. Sambrook y Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Ausubel y col., Greene  
10 Publishing Associates y Wiley-Interscience, Nueva York, 1988 (con actualizaciones periódicas); SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY: A COMPENDIUM OF METHODS FROM CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 5ª ed., vols. 1-2, ed. Ausubel y col., John Wiley & Sons, Inc., 2002; GENOME ANALYSIS: A LABORATORY MANUAL, vols. 1-2, ed. Green y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1997; PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999  
15 (denominado comúnmente como "informe del IOM").

- [0026]** La metodología que incluye técnicas de biología de plantas se describe en este documento y también se describe en detalle en tratados como METHODS IN PLANT MOLEULAR BIOLOGY: A LABORATORY COURSE MANUAL, ed. Maliga y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1995. Diversas  
20 técnicas que usan PCR se describen, por ejemplo en Innis y col., PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press, San Diego, 1990 y en Dieffenbach y Dveksler, PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2003. Los pares de cebadores para PCR pueden derivarse de secuencias conocidas por técnicas conocidas, como el uso de programas de ordenador destinados a este fin, por ejemplo, Primer, versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical  
25 Research, Cambridge, MA, EE. UU. Los procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-62 (1981) y Matteucci y Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981).

- [0027]** Las digestiones con enzimas de restricción, fosforilaciones, ligaciones y transformaciones se llevaron a  
30 cabo según se describe en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Todos los reactivos y materiales usados para el cultivo y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis. EE. UU.), DIFCO Laboratories (Detroit, Mich. EE. UU.), Invitrogen (Gaithersburg, Md., EE. UU.) o Sigma Chemical Company (San Luis, Mo. EE. UU.), a menos que se especifique de otro modo.  
35

- [0028]** Los términos "codificante" y "codifica" se refieren al proceso por el que un gen, a través de los mecanismos de transcripción y traducción, proporciona información a una célula, a partir de la cual puede ensamblarse una serie de aminoácidos en una secuencia aminoacídica específica para producir una enzima activa. A causa de la degeneración del código genético, algunos cambios de bases en la secuencia de ADN no cambian la  
40 secuencia aminoacídica de una proteína. Por lo tanto, se entiende que se contemplan modificaciones en las secuencias de ADN que codifican A622 y NBB1, respectivamente, que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales de cada una de las enzimas.

#### I. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 y 45 **NBB1**

- [0029]** Aunque A622 y NBB1 se habían identificado previamente, antes de la presente invención, el campo desconocía totalmente que la sobreexpresión de al menos uno de A622 o NBB1 en una planta de *Nicotiana* aumentara el contenido de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, la descripción abarca tanto la metodología como  
50 las construcciones para el aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*, mediante la sobreexpresión de al menos uno de A622 o NBB1. La sobreexpresión de los dos genes, A622 y NBB1, aumenta aún más los niveles de alcaloides nicotínicos en una planta de *Nicotiana*.

- [0030]** En la presente descripción, un "alcaloide" es un compuesto básico con nitrógeno que se encuentra en  
55 plantas y es producido por el metabolismo secundario. Un "alcaloide nicotínico" es nicotina o un alcaloide relacionado estructuralmente con la nicotina. En el caso del tabaco, el contenido de alcaloides nicotínicos y el contenido de alcaloides totales se usan como sinónimos.

- [0031]** Algunos alcaloides nicotínicos principales de *Nicotiana* ilustrativos incluyen, pero no se limitan a

nicotina, nornicotina, anatabina y anabasina. Algunos alcaloides secundarios ilustrativos de *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a anatabina, N-metilanatabina, N-metilanabasina, miosmina, anabaseína, N'-formilnornicotina, nicotirina y cotinina. Otros alcaloides secundarios en tabaco se describen, por ejemplo en Hecht, S. S. y col., *Accounts of Chemical Research* 12: 92-98 (1979); Tso, T. C., PRODUCTION, PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF TOBACCO PLANT, Ideals Inc. (Beltsville, MD), 1990.

**[0032]** Muchas otras bases de piridilo además de numerosos derivados de nornicotina, anatabina y anabasina son alcaloides nicotínicos de los que se ha descrito que están presentes en tabaco y para los fines de la presente invención deberán incluirse dentro de los alcaloides secundarios en *Nicotiana*. La mayoría de estos, así denominados, alcaloides nicotínicos secundarios están presentes en cantidades inferiores a 50 µg/g (con respecto a peso seco) y muchos otros están presentes en cantidades de nanogramos. Bush, L. P., y col., "Biosynthesis and metabolism in nicotine and related alkaloids" en NICOTINE AND RELATED ALKALOIDS, J. W. Gorrod y J. Wahren (eds.), Chapman y Hall, London (1993); Bush, L. P., y col., "Alkaloid Biosynthesis" en TOBACCO PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, 1999. Las estructuras químicas de varios alcaloides nicotínicos se presentan, por ejemplo, en Felpin y col., *J. Org. Chem.* 66: 6305-312 (2001).

**[0033]** La nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum*, así como en del 50 al 60 % de las otras especies de *Nicotiana*. Dependiendo de la variedad, de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 95 % de los alcaloides totales de *N. tabacum* es nicotina. Bush y col. (1999), referencia anterior; Hoffmann a col., *Journal of Toxicology and Environmental Health* 41: 1-52 (1994). Sobre la base de la acumulación de alcaloides en las hojas, nornicotina, anatabina y anabasina son los otros alcaloides principales en *N. tabacum*. Anatabina no es normalmente el alcaloide principal en ninguna especie de *Nicotiana*, pero se acumula en relativamente grandes cantidades en tres especies; anabasina es el alcaloide principal en cuatro especies. Nornicotina es el alcaloide principal en del 30 al 40 % de las especies de *Nicotiana*.

**[0034]** En esta descripción, "expresión" indica la producción del producto proteínico codificado por una secuencia nucleotídica. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto proteínico en un organismo transgénico que supera los niveles de producción en un organismo normal y no manipulado por ingeniería genética. Como es convencional en la técnica, las secuencias nucleotídicas se indican en letra cursiva (por ejemplo, *PTM*), mientras que las secuencias polipeptídicas no se escriben en letra cursiva (por ejemplo, PMT).

#### •A622

**[0035]** Se ha descrito que A622 muestra el mismo patrón de expresión que *PMT*. Shoji y col., *Plant Cell Physiol.* 41: 1072-76 (2000a) y *Plant Mol. Biol.* 50: 427-40 (2002). Ambos A622 y *PMT* se expresan específicamente en raíces, especialmente en el córtex y la endodermis de las partes apicales de las raíces y los pelos radicales. Además, A622 y *PMT* tienen un patrón de expresión común en respuesta a la regulación por *NIC* y la estimulación por metiljasmonato. A622 se induce en las raíces de *Nicotiana tabacum* en respuesta a lesiones de los tejidos aéreos Cane y col., *Func. Plant Biol.* 32: 305-20 (2005). En *N. glauca*, A622 se induce en hojas lesionadas en condiciones que resultan en la inducción de *QPT*. Sinclair y col., *Func. Plant Biol.* 31: 721-29 (2004).

**[0036]** Los locus *NIC1* y *NIC2* son dos locus genéticos independientes en *N. tabacum*, anteriormente designados como A y B. Las mutaciones *nic1* y *nic2* reducen los niveles de expresión de las enzimas de la biosíntesis de nicotina y el contenido de nicotina; generalmente el contenido de nicotina del tipo natural > el de plantas homocigotas para *nic2* > el de plantas homocigotas para *nic1* > el de plantas homocigotas para *nic1* y *nic2*. Legg y Collins *Can. J. Cyto.* 13: 287 (1971); Hibi y col., *Plant Cell* 6: 723-35 (1994); Reed y Jelesko, *Plant Science* 167: 1123 (2004). En esta descripción, "*nic1nic2*" indica genotipos de tabaco homocigotos para las dos mutaciones *nic1* y *nic2*.

**[0037]** La secuencia de ácido nucleico de A622 (SEQ ID NO: 3) ha sido determinada. Hibi y col. (1994), referencia anterior. La proteína A622 (SEQ ID NO: 4) codificada por esta secuencia de ácido nucleico es similar a las isoflavona-reductasas (IFR) y contiene un motivo de unión a NAPDH. A622 muestra homología con TP7, una reductasa de éter bencílico de fenilcumarano de tabaco (PCBER), implicada en la biosíntesis de lignina. Shoji y col. (2002), referencia anterior. Sin embargo, no se observó actividad de PCBER al ensayar la proteína A622 expresada en *E. coli* con dos sustratos diferentes.

**[0038]** Sobre la base de la corregulación de A622 y *PMT* y la similitud de A622 a las IFR, se propuso para A622 una función como reductasa en las etapas finales de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Hibi y col. (1994); Shoji y col. (2000a). Sin embargo, no se observó ninguna actividad de IFR al expresar la proteína en bacterias

(mismas referencias). Por lo tanto, de aquí no se dedujo que la sobreexpresión de A622 aumentara los niveles de nicotina.

**[0039]** La “expresión de A622” se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 3. La “sobreexpresión de A622” indica un aumento de la expresión de A622. La sobreexpresión de A622 ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de A622 incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de A622 desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 3), SEQ ID NO: 3B y todas las variantes polinucleotídicas de A622.

10

#### •NBB1

**[0040]** La secuencia de *NBB1* se identificó como un ADNc preparado a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, conforme al protocolo de Katoh y col., Proc. Japan Acad. 79 (Serie B): 151-54 (2003). Al igual que A622, *NBB1* está controlado los locus reguladores de la biosíntesis de nicotina, *NIC1* y *NIC2*. *NBB1* y *PMT* tienen el mismo patrón de expresión en las plantas de tabaco. La participación de *NBB1* en la biosíntesis de nicotina está indicada por el hecho de que *NBB1*, al igual que *PMT* y A622, está bajo el control de los genes *NIC* y muestra un patrón de expresión similar.

15

**[0041]** La secuencia de ácido nucleico de *NBB1* (SEQ ID NO: 1) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 2. La “expresión de *NBB1*” se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 1. La “sobreexpresión de *NBB1*” indica un aumento de la expresión de *NBB1*. La sobreexpresión de *NBB1* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *NBB1* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1B y todas las variantes polinucleotídicas de *NBB1*.

20

## II. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de *PMT*

**[0042]** El único informe anterior que demuestra la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de nicotina en una especie de *Nicotiana* fue en *N. sylvestris*, en la que la sobreexpresión de *PMT* resultó en un aumento moderado del 40 % de la nicotina en la hoja. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001). Mientras que la sobreexpresión de un gen de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en una especie vegetal como *N. sylvestris*, resulta en un aumento de la acumulación de metabolitos secundarios, esto no quiere decir necesariamente que se vaya a producir una acumulación similar de metabolitos secundarios en una especie relacionada como *N. tabacum*. Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Esto es especialmente relevante para la sobreexpresión de *PTM*, dado que *N. tabacum* contiene cinco genes *PTM* expresados y *N. sylvestris* contiene tres genes *PTM* expresados. Hashimoto y col., Plant Mol. Biol. 37: 25-37 (1998); Reichers y Timko, Plant Mol. Biol. 41: 387-401 (1999). De hecho, cuando el gen *PTM* de *N. tabacum* se expresó en exceso en cultivos de raíces capilares de *Duboisia*, los niveles de nicotina, hiosciamina y escopolamina no aumentaron significativamente. Moyano y col., Phytochemistry 59, 697-702 (2002). Igualmente, la sobreexpresión del mismo gen *PTM* en plantas y cultivos de raíces capilares transgénicos de *Atropa belladonna* no afectó a los niveles de hiosciamina y escopolamina. Sato y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 367-72 (2001); Rothe y col., J. Exp. Bot. 54: 2065-070 (2003).

30

35

40

**[0043]** En especies solanáceas, como el tabaco, parece ser que la misma ruta de biosíntesis de alcaloides en dos especies de plantas relacionadas puede regularse de manera diferente y la sobreexpresión de un gen dado no conduce necesariamente a un patrón similar de acumulación de metabolitos secundarios. Moyano y col., J. Exp. Bot. 54: 203-11 (2003). Por ejemplo, en el análisis de sesenta especies de *Nicotiana* se observó una variación considerable en el contenido de alcaloides totales y en el perfil de alcaloides entre las especies. Saitoh y col., Phytochemistry 24: 477-80 (1985). Por ejemplo, mientras que *N. sylvestris* mostró el mayor contenido en peso seco de alcaloides totales (la suma de nicotina, nornicotina, anabasina y anatabina), con 29.600 µg/g o el 2,96 %, *N. alata* mostró el menor contenido, con 20 µg/g o el 0,002 %. La proporción de nicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue de aproximadamente el 80 %, en comparación con aproximadamente el 95 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Además, la proporción de nornicotina en relación con los alcaloides totales en las hojas de *N. sylvestris* fue del 19,1 % en comparación con el 3 % para *N. tabacum* L. (misma referencia). Sobre la base de estas amplias variaciones entre las sesenta especies de *Nicotiana*, Saitoh y col. concluyen que la cantidad y la proporción de alcaloides totales e individuales presentes en una planta depende de la especie y que no parece existir una correlación clara entre el patrón de alcaloides y la clasificación del género *Nicotiana* (página 477 en la misma referencia).

45

50

55

[0044] Por consiguiente, se da a conocer una metodología y construcciones para aumentar los alcaloides nicotínicos en *N. tabacum* mediante la sobreexpresión de *PMT*.

[0045] La secuencia de ácido nucleico de *PTM* (SEQ ID NO: 7) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 8. La "expresión de *PTM*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 7. La "sobreexpresión de *PTM*" indica un aumento de la expresión de *PTM*. La sobreexpresión de *PTM* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *PTM* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *PTM* desvelada en Hibi y col. (1994), referencia anterior (SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 7B y todas las variantes polinucleotídicas de *PTM*.

### III. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PMT*

[0046] Hasta ahora no se sabía que la sobreexpresión de *QPT* y *PTM* aumentara sinérgicamente los alcaloides nicotínicos. Es decir, que fuera posible alcanzar mayores aumentos de los niveles de nicotina mediante la sobreexpresión de *QPT* y *PTM*, en comparación con la sobreexpresión de solo *QPT* o *PTM*. Conforme a este aspecto de la invención, se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende ambos *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*.

[0047] La secuencia de ácido nucleico de *QPT* (SEQ ID NO: 5) ha sido determinada y codifica la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO: 6. La "expresión de *QPT*" se refiere a la biosíntesis de un producto génico codificado por SEQ ID NO: 5. La "sobreexpresión de *QPT*" indica un aumento de la expresión de *QPT*. La sobreexpresión de *QPT* ocasiona un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos en una planta o célula en la que tiene lugar dicha sobreexpresión. La sobreexpresión de *QPT* incluye la biosíntesis de un producto génico codificado por los siguientes: la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de *QPT* según se desvela en la patente de los EE. UU. n° 6.423.520 (SEQ ID NO: 5), SEQ ID NO: 5B y todas las variantes polinucleotídicas de *QPT*.

### IV. Aumento de los alcaloides nicotínicos en *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT*

[0048] Mientras que es bien sabido que *QPT* desempeña un papel en la biosíntesis de nicotina, véase el documento WO 98/56923, la presente descripción contempla mayores aumentos de la síntesis de nicotina mediante la sobreexpresión de al menos dos o más de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en *Nicotiana*. Conforme a esta descripción, se introduce una construcción de ácido nucleico que comprende al menos dos de *A622*, *NBB1*, *QPT* y *PMT* en una célula vegetal de *Nicotiana*. Una construcción de ácido nucleico ilustrativa puede comprender *QPT* y *A622*.

### V. Aumento de los alcaloides nicotínicos y el rendimiento en *Nicotiana*

[0049] Las plantas con aumento de nicotina de la invención pueden producirse por mejora convencional o cruzamientos, según se describen por Wernsman y col., en 2 PRINCIPLES OF CULTIVAR DEVELOPMENT: CROP SPECIES (Macmillan 1997). Por ejemplo, se emplea un transformante manipulado por ingeniería genética, regenerado a partir de material de tabaco que contiene el transgén adecuado, para introducir por introgresión un carácter de alto nivel de nicotina en un fondo genético comercialmente aceptable y deseable, con lo que se obtiene un cultivar o variedad de tabaco que combina un alto nivel de nicotina con dicho fondo genético deseable.

[0050] De manera similar, por ejemplo, puede producirse una planta manipulada por ingeniería genética que exprese en exceso *QPT* y *A622* mediante el cruzamiento de una planta transgénica que expresa en exceso *QPT* con una planta transgénica que expresa en exceso *A622*. Después de varios ciclos sucesivos de cruzamiento y selección, puede seleccionarse una planta manipulada por ingeniería genética que expresa en exceso *QPT* y *A622*.

[0051] Mientras que cualquier gen deseable puede introducirse por introgresión en una variedad de alto nivel de nicotina, existe la necesidad crítica de introducir un carácter de alto nivel de nicotina en el fondo genético de un tabaco de alto rendimiento. Varios estudios indican que las mejoras del rendimiento han sido dificultadas por la correlación negativa que existe con la concentración de nicotina. PRODUCTION, CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, D. L. Davis y M. T. Nielson (eds.) Coresta, en la página 46 (1999). En sus reflexiones sobre la mejora del tabaco, el Dr. Earl Wernsman afirma que la selección continuada en busca solamente de rendimiento resultará pronto en una población con una concentración de nicotina en la hoja curada tan baja que dichos tabacos serán inaceptables para la industria. Wernsman, Recent Advances in Tobacco, Science 25: 5-35 (1999). Wernsman postula que pueden necesitarse procedimientos genéticos de regulación por aumento de la síntesis de nicotina para

permitir aumentos adicionales de la capacidad de rendimiento, mientras se mantiene la concentración de nicotina (misma referencia).

**[0052]** Por consiguiente, la presente descripción proporciona un modo de corregir la “correlación negativa” entre el rendimiento y el contenido de nicotina en plantas de *Nicotiana* mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina en una planta de *Nicotiana* de alto rendimiento. Las enzimas de la biosíntesis de nicotina de ejemplo incluyen, pero no se limitan a QPTasa, PMTasa, A622, NBB1, arginina-d Descarboxilasa (ADC), metilputrescina-oxidasa (MPO), NADH-deshidrogenasa, ornitina-d Descarboxilasa (ODC) y S-adenosilmetionina-sintetasa (SAMS). Las plantas con aumento de nicotina que resultan de aquí se cruzan después con cualquier fondo genético comercialmente aceptable y deseable que mantenga un alto rendimiento. Las plantas de *Nicotiana* de alto rendimiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a los cultivares de *Nicotiana tabacum* K326, NC71, NC72 y RG81. Después de ciclos sucesivos de cruzamiento y selección se produce consiguientemente una planta manipulada por ingeniería genética con aumento de nicotina y del rendimiento.

**[0053]** Un aspecto adicional descrito es el cruzamiento de una planta con aumento de nicotina con una planta con aumento del rendimiento como otra estrategia para romper la correlación negativa entre el contenido de nicotina y el rendimiento.

**[0054]** Los “genes de aumento del rendimiento” abarcan cualquier gen cuya expresión se correlaciona con un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de CO<sub>2</sub>, más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

**[0055]** Igualmente, una “planta con aumento del rendimiento” se refiere a una planta o cualquier porción de la misma que expresa en exceso un “gen de aumento del rendimiento” y muestra un aumento de la capacidad de producción, según se refleja, por ejemplo, por un aumento de la producción de fotoasimilado, aumento de la tasa de crecimiento, mejor vigor, mayor rendimiento, mayor fijación de CO<sub>2</sub>, más biomasa, aumento de la producción de semillas, mejor almacenamiento, aumento de la tolerancia a enfermedades, aumento de la tolerancia a insectos, aumento de la tolerancia al estrés hídrico, mayor dulzor, mejor composición de almidón, mejor acumulación y exportación de sacarosa y mejor respuesta al estrés oxidativo, en comparación con una planta de control natural.

**[0056]** Por ejemplo, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen relacionado con la patogénesis (PR). Se ha demostrado que la sobreexpresión de un gen *PRms* de maíz en tabaco produce plantas transgénicas de tabaco con más biomasa y mayor producción de semillas. Murillo y col., Plant J. 36: 330-41 (2003). Igualmente, una planta con aumento del rendimiento puede producirse mediante la sobreexpresión de un gen codificante de una enzima del ciclo de Calvin. Tamoi y col. Plant Cell Physiol. 47(3): 380-390 (2006). Por ejemplo, las plantas de tabaco que expresaban en exceso una fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa de cianobacterias mostraron mayor eficiencia fotosintética y eficiencia de crecimiento en comparación con el tabaco natural. Miyagawa y col., Nature Biotech. 19: 965-69 (2001).

**[0057]** La presente descripción también contempla la producción de una planta con aumento del rendimiento y aumento de nicotina mediante la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima de la biosíntesis de nicotina, como *QPT*, *PMT*, *A622* o *NBB1*, y la sobreexpresión de un gen de aumento del rendimiento, como *PRms*, fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa en la misma planta o célula.

## **50 VI. Producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en células no productoras de nicotina.**

**[0058]** *A622* y *NBB1* pueden introducirse en una planta o célula no productora de nicotina, con lo que se producirá nicotina o compuestos relacionados en un organismo o célula que de otro modo no produce estos compuestos. A partir de estos organismos o células manipulados pueden producirse diversos productos, incluida nicotina, análogos de nicotina y enzimas de la biosíntesis de la nicotina.

**[0059]** Una “planta no productora de nicotina” se refiere a cualquier planta que no produce nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas plantas no productoras de nicotina ilustrativas incluyen, pero no se limitan a *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*.

**[0060]** Las “células no productoras de nicotina” se refieren a células de cualquier organismo que no producen nicotina ni alcaloides nicotínicos relacionados. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias.

**[0061]** Un “análogo de nicotina” tiene la estructura básica de la nicotina, pero puede tener, por ejemplo, diferentes sustituyentes en el anillo. Por ejemplo, un análogo de la nicotina puede sustituir un hidrógeno (-H) por el grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), con lo que se produce nornicotina, que es un análogo de la nicotina. Además de tener en común una estructura similar con la nicotina, los análogos de nicotina pueden producir efectos fisiológicos similares. Por ejemplo, la cotinina se ha citado por sus efectos positivos en la mejora de la concentración y la memoria y, consiguientemente, es un análogo de la nicotina. Por consiguiente, los análogos de la nicotina se definen ampliamente para cubrir todos y cada uno de los compuestos que tienen una estructura y actividad funcional similar a la de la nicotina.

15

## VII. Síntesis de compuestos mediante el uso de nuevas enzimas

**[0062]** Recientemente, ha habido gran interés en la síntesis de análogos que reconozcan específicamente los receptores de la nicotina y proporcionen efectos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas y discapacidades cognitivas. Por ejemplo, Targacept, una empresa farmacéutica formada como extensión de R. J. Reynolds Tobacco Company, se esfuerza en desarrollar y comercializar fármacos análogos de la nicotina, basados en la activación selectiva de receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina (NNR). Dado que la presente invención proporciona una nueva enzima de la biosíntesis de nicotina, puede ser valioso el uso de NBB1 solo, o NBB1 y A622, para el desarrollo de nuevos análogos de nicotina. Por ejemplo, mediante el uso de los procedimientos y construcciones de la invención, puede producirse un análogo de un alcaloide nicotínico al proporcionar un precursor análogo de la nicotina a un sistema de cultivo celular.

**[0063]** Adicionalmente, las enzimas pueden usarse para la síntesis *in vitro* de nicotina y compuestos relacionados. Es decir, pueden usarse A622 y NBB1 recombinantes para la síntesis o la síntesis parcial de un alcaloide nicotínico y un análogo de un alcaloide nicotínico.

30

### Secuencias de biosíntesis de alcaloides nicotínicos

**[0064]** Se han identificado genes de biosíntesis de alcaloides nicotínicos en varias especies de plantas, como por ejemplo, plantas de *Nicotiana*. Por consiguiente, la presente descripción abarca cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc aislada de una especie de plantas o producida sintéticamente que aumente la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en *Nicotiana*. Adicionalmente, la expresión de tal secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos produce alcaloides nicotínicos en una célula no productora de nicotina, como una célula de un insecto. El ADN o ARN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también denominada hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada hebra antisentido.

**[0065]** Se entiende que *NBB1*, *A622*, *QPT* y *PMT* incluyen las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, así como moléculas de ácido nucleico compuestas por variantes de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas, en que las variantes codifican un polipéptido con actividad de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, las secuencias con “secuencias de bases con una o más bases suprimidas, sustituidas, insertadas o añadidas” retienen la actividad fisiológica incluso cuando la secuencia aminoacídica codificada tiene uno o más aminoácidos sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos. Adicionalmente, pueden existir múltiples formas de *A622*, *NBB1*, *QTPasa* y *PTMasa*, que pueden deberse a la modificación postraduccional de un producto génico o a múltiples formas de los genes *PMT*, *QPT*, *A622* o *NBB1* respectivos. Las secuencias nucleotídicas que tienen tales modificaciones y que codifican una enzima de biosíntesis de alcaloides nicotínicos están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

**[0066]** Por ejemplo, pueden suprimirse las regiones no traducidas de la cola de poli A o los extremos 5' o 3' y pueden suprimirse bases hasta llegar a la supresión de aminoácidos. También es posible sustituir bases, siempre que no se produzcan cambios en el marco de lectura. Asimismo pueden “añadirse” bases hasta llegar a añadir aminoácidos. Sin embargo, es esencial que ninguna de tales modificaciones resulte en la pérdida de la actividad enzimática de biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Un ADN modificado en este contexto puede obtenerse por

55

modificación de las secuencias de bases del ADN, de modo que se sustituyan, supriman, inserten o añadan aminoácidos en sitios específicos, por ejemplo, por mutación específica. Zoller y Smith, *Nucleic Acid Res.* 10: 6487-500 (1982).

5 **[0067]** Una secuencia de biosíntesis de alcaloides nicotínicos puede sintetizarse desde el principio a partir de las bases apropiadas, por ejemplo, mediante el uso de una secuencia proteínica apropiada desvelada en este documento como guía para crear una molécula de ADN que, aunque diferente de la secuencia nativa de ADN, resulta en la producción de una proteína con la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia similar. Este tipo de molécula sintética de ADN es útil a la hora de introducir en una célula no vegetal una secuencia de ADN que  
10 codifica una proteína heteróloga que refleja frecuencias de uso de codones diferentes (distintas de las de plantas) y que si se usa sin modificar puede resultar en una traducción ineficiente por la célula huésped.

**[0068]** Con molécula(s) de ácido nucleico "aislada(s)" se indica una molécula o moléculas de ácido nucleico, ADN o ARN, extraída(s) de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en una  
15 construcción de ADN se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas de ADN que están purificadas, parcial o sustancialmente, en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN, producidos *in vitro*, de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además aquellas moléculas producidas  
20 sintéticamente.

**[0069]** Un "ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia) mediante una actividad humana. Tal ácido nucleico exógeno puede ser una copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos  
25 de la misma.

**[0070]** Por el contrario, un "ácido nucleico endógeno" se refiere a un ácido nucleico, gen, polinucleótido o molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc que está presente en el genoma de una planta u organismo que va a manipularse por ingeniería genética. Una secuencia endógena es "nativa", es decir, autóctona de la planta u  
30 organismo que va a manipularse por ingeniería genética.

**[0071]** Un "ácido nucleico heterólogo" se refiere a un ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido introducido en una célula (o su organismo de procedencia), que no es una copia de una secuencia que se encuentre de forma natural en la célula en la que se introduce. Tal ácido nucleico heterólogo puede comprender segmentos que son  
35 copia de una secuencia que se encuentra de forma natural en la célula en la que se ha introducido o fragmentos de la misma.

**[0072]** Un "ácido nucleico quimérico" comprende una secuencia codificante o un fragmento de la misma unido a una región de iniciación de la transcripción que es diferente de la región de iniciación de la transcripción con la que  
40 está asociada en las células en las que la secuencia se encuentra de forma natural.

**[0073]** A menos que se indique de otro modo, todas las secuencias nucleotídicas determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en este documento se determinaron mediante un secuenciador automático de ADN, como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc. Por lo tanto, como es sabido en la técnica para toda  
45 secuencia determinada mediante esta estrategia automática, cualquier secuencia nucleotídica determinada en este documento puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas de manera automática son típicamente idénticas en al menos aproximadamente el 95 %, más típicamente, idénticas en al menos de aproximadamente el 96 % a al menos aproximadamente el 99,9 % a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de manera más precisa por otras estrategias, incluidos  
50 los procedimientos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se sabe en la técnica, una única inserción o delección en una determinada secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia real causará un cambio del marco de lectura en la traducción de dicha secuencia nucleotídica, de modo que la secuencia aminoacídica prevista codificada por una secuencia nucleotídica determinada puede ser completamente diferente de la secuencia aminoacídica codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, a partir del punto  
55 de tal inserción o delección.

**[0074]** Dos secuencias hibridan cuando forman un complejo bicatenario en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo inespecífico. Véase Ausubel y col, referencia anterior, en la sección 2.9, suplemento 27 (1994). Las secuencias pueden hibridar en condiciones de

“astringencia moderada”, que se definen como una temperatura de 60 °C en una disolución de hibridación de 6x SSC, SDS al 0,5 %, 5x disolución de Denhardt y 100 µg de un ADN vehículo inespecífico. Para una hibridación de “alta astringencia”, la temperatura se eleva a 68 °C. Después de la reacción de hibridación de astringencia moderada, los nucleótidos se lavan en una disolución de 2x SSC más SDS al 0,05 % cinco veces a temperatura ambiente, con lavados subsiguientes con 0,1x SSC más SDS al 0,1 % a 60 °C durante 1 h. Para una alta astringencia, la temperatura de lavado se aumenta a 68 °C. Los nucleótidos hibridados son aquellos que se detectan al usar 1 ng de una sonda radiomarcada con una radiactividad específica de 10.000 cuentas por minuto/ng, en que los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de la exposición a una película de rayos X a -70 °C durante no más de 72 horas.

10

**[0075]** La presente solicitud se dirige a aquellas moléculas de ácido nucleico que son idénticas en al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico descrita en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Se prefieren moléculas de ácido nucleico idénticas en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % a la secuencia de ácido nucleico mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7 B. Las diferencias entre dos secuencias de ácido nucleico pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos dentro de la secuencia de referencia.

15

**[0076]** En la práctica, que una molécula de ácido nucleico concreta sea idéntica en al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % a una secuencia nucleotídica de referencia se refiere a una comparación establecida entre dos moléculas llevada a cabo con el uso de algoritmos estándar bien conocidos en la técnica y puede determinarse convencionalmente mediante programas de ordenador disponibles al público como el algoritmo BLASTN. Véase Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402 (1997).

20

**[0077]** La presente descripción proporciona además moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, 1B, 3, 3B, 5, 5B, 7 y 7B, respectivamente, la cual codifica un enzima activa de la biosíntesis de nicotina, en que la enzima tiene la secuencia aminoacídica que corresponde a SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, respectivamente, y en que la proteína comprende sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos que no alteran la funcionalidad de la enzima de la biosíntesis de nicotina.

25

**[0078]** Una “variante” es una secuencia nucleotídica o aminoacídica que se desvía de la secuencia nucleotídica o aminoacídica estándar o dada de un gen o proteína en concreto. Los términos “isoforma”, “isotipo” y “análogo” también se refieren a formas “variantes” de una secuencia nucleotídica o aminoacídica. Una secuencia aminoacídica alterada por la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos o un cambio de la secuencia nucleotídica puede considerarse una secuencia “variante”. La variante puede tener cambios “conservadores”, en que el aminoácido sustitutivo tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. Una variante puede tener cambios “no conservadores”, por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Otras variaciones análogas secundarias pueden incluir también deleciones o inserciones de aminoácidos o ambas. Es posible obtener una orientación para determinar qué restos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse o suprimirse mediante programas de ordenador bien conocidos en la técnica como Vector NTI Suite (InforMax, MD, EE. UU.). Una “variante” también puede referirse a un “gen reordenado”, como los descritos en las patentes asignadas a Maxygen.

30

35

#### 45 **Construcciones de ácidos nucleicos**

**[0079]** Una secuencia que aumenta la biosíntesis de alcaloides nicotínicos se incorpora a una construcción de ácido nucleico que es adecuada para la transformación de plantas o células. De este modo, una construcción de ácido nucleico tal puede usarse para la sobreexpresión de al menos uno de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT* en una planta, así como para la expresión de *A622* y *NBB1*, por ejemplo, en una célula no productora de nicotina.

40

45

**[0080]** Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes pueden llevarse a cabo mediante técnicas estándar. Por ejemplo, la secuencia de ADN para transcripción puede obtenerse tratando un vector que contiene dicha secuencia con enzimas de restricción para escindir el segmento adecuado. La secuencia de ADN para transcripción puede generarse también por hibridación y ligación de oligonucleótidos sintéticos o mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener sitios de restricción adecuados en cada extremo. La secuencia de ADN se clona después en un vector que contiene elementos de regulación adecuados, como un promotor en la región 5' y secuencias de terminación en la región 3'.

50

**[0081]** Un aspecto importante de la presente invención es el uso de construcciones de ácidos nucleicos en las que una secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides nicotínicos está unida operativamente a una o más secuencias de regulación que controlan la expresión de la secuencia codificante para la biosíntesis de alcaloides nicotínicos en ciertos tipos de células, órganos o tejidos sin afectar excesivamente al desarrollo o fisiología normales.

5

**[0082]** El "promotor" designa una región de ADN en la región 5' con respecto al inicio de la transcripción que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un "promotor constitutivo" es un promotor que es activo durante toda la vida de la planta y en la mayoría de las condiciones ambientales. Los promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles constituyen la clase de "promotores no constitutivos". "Unido operativamente" se refiere a una conexión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en que la secuencia promotora inicia e interviene en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas.

10

**[0083]** Los promotores útiles para la expresión de una secuencia de ácido nucleico introducida en una célula para aumentar la expresión de A622, NBB1, PMTasa o QPTasa pueden ser promotores constitutivos, como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o promotores específicos de tejidos, con preferencia de tejidos, específicos de tipos celulares e inducibles. Los promotores preferidos incluyen promotores que son activos en tejidos radicales, como el promotor RB7 de tabaco (Hsu y col. Pestic. Sci. 44: 9-19 (1995); patente de los EE. UU. n° 5.459.252), el promotor CRWAQ81 de maíz (solicitud de patente publicada de los EE. UU. 20050097633); el promotor ARSK1 de *Arabidopsis* (Hwang y Goodman, Plant J. 8: 37-43 (1995)), el promotor MR7 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.837.848), el promotor ZRP2 de maíz (patente de los EE. UU. n° 5.633.363), el promotor MTL de maíz (patentes de los EE. UU. n° 5.466.785 y n° 6.018.099), los promotores MRS1, MRS2, MRS3 y MRS4 de maíz (solicitud de patente de los EE. UU. 20050010974), un promotor críptico de *Arabidopsis* (solicitud de patente de los EE. UU. 20030106105) y promotores que se activan en condiciones que resultan en la elevada expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotina como el promotor RD2 de tabaco (patente de los EE. UU. n° 5.837.876), los promotores de *PMT* (Shoji T. y col., Plant Cell Physiol. 41: 831-39 (2000b); documento WO 2002/038588) o un promotor de A622 (Shoji T. y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002)).

20

25

**[0084]** Los vectores pueden contener también secuencias de terminación, que se sitúan en la región 3' de las moléculas de ácido nucleico, para terminar dicha transcripción de ARNm y añadir secuencias de poli A. Algunos ejemplos de tales terminadores son el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen de la nopalina-sintasa (Tnos). El vector de expresión puede contener también potenciadores, codones de inicio, secuencias señal de corte y epalme y secuencias localizadoras.

30

**[0085]** Los vectores de expresión pueden contener también un marcador de selección, mediante el que pueden identificarse las células transformadas en cultivo. El marcador puede estar asociado con la molécula de ácido nucleico heteróloga, es decir, el gen unido operativamente a un promotor. Según se usa en este documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un carácter o un fenotipo que permite la selección o la identificación de plantas o células que contienen el marcador. En plantas, por ejemplo, el gen marcador codificará la resistencia a un antibiótico o un herbicida. Esto permite la selección de las células transformadas de entre las células que no están transformadas o transfectadas.

40

**[0086]** Algunos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen adenosina-desaminasa, dihidrofolato-reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina-cinasa, xantina-guanina-fosforribosiltransferasa, resistencia a glifosato y glufosinato y aminoglucósido-3'-O-fosfotransferasa (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Estos marcadores pueden incluir la resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina y gentamicina. La construcción puede contener también el gen marcador seleccionable *Bar*, que confiere resistencia a análogos del herbicida fosfotricina, como glufosinato de amonio. Thompson y col., EMBO J. 9: 2519-23 (1987). También se conocen otros marcadores de selección adecuados.

50

**[0087]** Pueden usarse marcadores visibles como la proteína verde fluorescente (GFP). También se han descrito procedimientos para la identificación o selección de plantas transformadas basados en el control de la división celular. Véanse los documentos WO 2000/052168 y WO 2001/059086.

55

**[0088]** También pueden incluirse secuencias de replicación de origen bacteriano o vírico para permitir la clonación del vector en un huésped bacteriano o fágico. Preferentemente se usa un origen de replicación procariótico de amplio espectro de huésped. También puede incluirse un marcador seleccionable para bacterias para permitir la selección de células bacterianas que contienen la construcción deseada. Los marcadores

seleccionables procarióticos adecuados incluyen además resistencia a antibióticos como kanamicina o tetraciclina.

**[0089]** También puede haber presentes en el vector otras secuencias de ácido nucleico codificantes de funciones adicionales, según se conocen en la técnica. Por ejemplo, si el huésped es *Agrobacterium*, pueden incluirse secuencias de ADN-T para facilitar la transferencia posterior y la incorporación en los cromosomas de la planta.

### **Plantas para ingeniería genética**

10 **[0090]** La presente invención comprende la manipulación genética de una planta de *Nicotiana* para aumentar la síntesis de alcaloides nicotínicos por medio de la introducción de una secuencia polinucleotídica que codifica una enzima de la ruta de la síntesis de alcaloides nicotínicos. Adicionalmente, la descripción proporciona procedimientos para la producción de alcaloides nicotínicos y compuestos relacionados en plantas no productoras de nicotina, como *Arabidopsis thaliana* y *Atropa belladonna*.

15 **[0091]** La “manipulación por ingeniería genética” (GE) abarca cualquier metodología para la introducción de un ácido nucleico o una mutación específica en un organismo huésped. Por ejemplo, una planta de tabaco está manipulada por ingeniería genética cuando está transformada con una secuencia polinucleotídica que aumenta la expresión de un gen, como *A622* o *NBB1*, con lo que aumentan los niveles de nicotina. Por el contrario, una planta  
20 de tabaco que no está transformada con una secuencia polinucleotídica es una planta de control y se denomina planta “sin transformar”.

**[0092]** En el presente contexto, la categoría “manipuladas por ingeniería genética” incluye plantas y células “transgénicas” (véase la definición en la referencia a continuación), así como plantas y células producidas por medio  
25 de mutagénesis dirigida, efectuada, por ejemplo, a través del uso de oligonucleótidos quiméricos ARN/ADN, según se describe en Beetham y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 96: 8774-8778 (1999) y Zhu y col., en la referencia citada, páginas 8768-8773, o las denominadas “oligonucleobases recombinogénicas”, según se describen en la solicitud PCT WO 03/013226. Igualmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede producirse mediante la introducción de un virus modificado que, a su vez, causa una modificación genética en el huésped que resulta  
30 similar a las producidas en una planta transgénica, según se describe en este documento. Véase la patente de los EE. UU. n° 4.407.956. Adicionalmente, una planta o célula manipulada por ingeniería genética puede ser el producto de cualquier estrategia nativa (es decir, que no implica secuencias nucleotídicas exógenas), implementada por la introducción solamente de secuencias de ácido nucleico derivadas de la especie huésped o de una especie sexualmente compatible. Véase, por ejemplo, la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0107455.

35 **[0093]** “Planta” es un término que abarca plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales diferenciadas o indiferenciadas y la descendencia de las mismas. El material vegetal incluye, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, gametofitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que pueden  
40 usarse en la presente invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores en la que es posible aplicar técnicas de ingeniería genética, incluidas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como gimnospermas. Las plantas productoras de nicotina preferidas incluyen los géneros *Nicotiana*, *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas.

45 **[0094]** “Tabaco” se refiere a cualquier planta en el género *Nicotiana* que produce alcaloides nicotínicos. Tabaco también se refiere a productos que comprenden material producido a partir de una planta de *Nicotiana* e incluye, por lo tanto, tabaco expandido, tabaco reconstituido, cigarrillos, cigarros, tabaco de mascar o formas de tabaco sin humo, rapé y snus preparados a partir de tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética. Algunos ejemplos de la especie *Nicotiana* incluyen, pero no se limitan a los siguientes: *Nicotiana acaulis*,  
50 *Nicotiana acuminata*, *Nicotiana acuminata* var. *multiflora*, *Nicotiana africana*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana amplexicaulis*, *Nicotiana arentsii*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana benavidesii*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana bonariensis*, *Nicotiana cavicola*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana cordifolia*, *Nicotiana corymbosa*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana forgetiana*, *Nicotiana fragrans*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana goodspeedii*, *Nicotiana gossei*, *Nicotiana hybrid*, *Nicotiana ingulba*, *Nicotiana kawakamii*, *Nicotiana knightiana*,  
55 *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana linearis*, *Nicotiana longiflora*, *Nicotiana maritima*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana miersii*, *Nicotiana noctiflora*, *Nicotiana nudicaulis*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*, *Nicotiana otophora*, *Nicotiana paniculata*, *Nicotiana pauciflora*, *Nicotiana petunioides*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana raimondii*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rosulata*, *Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*, *Nicotiana rotundifolia*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana setchellii*, *Nicotiana simulans*, *Nicotiana solanifolia*,

*Nicotiana spegazzinii*, *Nicotiana stocktonii*, *Nicotiana suaveolens*, *Nicotiana sylvestris*, *N. tabacum*, *Nicotiana thyrsoiflora*, *Nicotiana tomentosa*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana trigonophylla*, *Nicotiana umbratica*, *Nicotiana undulata*, *Nicotiana velutina*, *Nicotiana wigandoides* y *Nicotiana x sanderae*.

- 5 **[0095]** En la presente descripción, las “raíces capilares de tabaco” se refieren a raíces de tabaco que tienen ADN-T de un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* integrado en el genoma y crecen en cultivo sin la adición de auxina u otras fitohormonas. Las raíces capilares de tabaco producen alcaloides nicotínicos al igual que las raíces de una planta de tabaco. Estos tipos de raíces se caracterizan por un crecimiento rápido, ramificación frecuente, plagiotropismo y la capacidad de sintetizar los mismos compuestos que las raíces de la planta intacta. David y col.,  
10 *Biotechnology 2*: 73-76 (1984). Las raíces de las plantas solanáceas constituyen el lugar principal de biosíntesis de alcaloides tropánicos y, por lo tanto, los cultivos de raíces capilares son capaces de acumular altos niveles de estos metabolitos. Por ejemplo, véase Oksman-Caldentey & Arroo, "Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures," en *METABOLIC ENGINEERING OF PLANT SECONDARY METABOLISM* 253-81 (Kluwer Academic Publishers, 2000).

15

#### **Células no productoras de nicotina para ingeniería genética**

- [0096]** La descripción contempla la manipulación por ingeniería genética de “células no productoras de nicotina” con una secuencia de ácido nucleico codificante de una enzima implicada en la producción de alcaloides  
20 nicotínicos. Una célula no productora de nicotina se refiere a una célula de cualquier organismo que no produce nicotina. Algunas células ilustrativas incluyen, pero no se limitan a células de plantas como *Atropa belladonna*, *Arabidopsis thaliana*, así como células de insectos, mamíferos, levaduras, hongos, algas o bacterias. Las células huésped adecuadas se discuten más detalladamente en Goeddel, *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic Press, San Diego, California (1990).

25

- [0097]** Una “célula de insecto” se refiere a cualquier célula de un insecto que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células de insectos ilustrativas incluyen las células Sf9 (ATCC CRL 1711).

- 30 **[0098]** Una “célula fúngica” se refiere a cualquier célula de un hongo que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células fúngicas ilustrativas incluyen células de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Baldari y col., 1987. *EMBO J.* 6: 229-234) y *Pichia pastoris* (por ejemplo, *P. pastoris* KM714, disponible de Invitrogen). También pueden usarse células de hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Trichoderma*. Archer y  
35 col., *Antonie van Leeuwenhoek* 65: 245-250 (2004).

- [0099]** Una “célula bacteriana” se refiere a cualquier célula bacteriana que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células bacterianas ilustrativas incluyen *E. coli*, como la cepa de *E. coli* M15/rep4,  
40 disponible comercialmente de QIAGEN.

- [0100]** Una “célula de mamífero” se refiere a cualquier célula de un mamífero que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina y que es capaz de expresar la enzima o sus productos en cantidades recuperables. Algunas células de mamíferos ilustrativas incluyen las células de ovario de hámster  
45 chino (CHO) o células COS. Las células de mamíferos pueden incluir también un ovocito fertilizado o una célula madre embrionaria no humana en la que se han introducido secuencias codificantes de una enzima de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos. Tales células huésped pueden usarse después para crear animales transgénicos no humanos. Algunos ejemplos de sistemas para la expresión regulada de proteínas en células de mamíferos incluyen los sistemas de expresión génica Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares. Gossen y Bujard, *Proc. Natl.*  
50 *Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992).

- [0101]** Una “célula de alga” se refiere a cualquier especie de alga que puede transformarse con un gen codificante de una enzima de la biosíntesis de nicotina sin afectar al desarrollo o la fisiología normal del alga. Algunas células de algas ilustrativas incluyen *Chlamydomonas reinhardtii* (Mayfield y Franklin, *Vaccine* 23: 1828-  
55 1832 (2005).

- [0102]** Dado que la producción de alcaloides nicotínicos en una célula de un insecto podría afectar negativamente al crecimiento y desarrollo del insecto, un sistema de expresión inducible puede mitigar los efectos adversos. Por ejemplo, las células de insecto pueden permitirse crecer primeramente en condiciones no inductoras

hasta un estado deseado y entonces se induce la expresión de la enzima.

**[0103]** Adicionalmente, es posible suministrar precursores a las células que expresan los genes de la biosíntesis de alcaloides nicotínicos para aumentar la disponibilidad de sustrato para la síntesis de dichos alcaloides nicotínicos. También pueden suministrarse a las células análogos de precursores que pueden incorporarse en análogos de alcaloides nicotínicos de origen natural.

### **Transformación y selección**

10 **[0104]** Mientras que la nicotina es el principal alcaloide en *N. tabacum* y algunas otras especies del género *Nicotiana*, otras plantas tienen la capacidad de producir nicotina, por ejemplo los géneros *Duboisia*, *Anthoceros* y *Salpiglossis* en las solanáceas o los géneros *Eclipta* y *Zinnia* en las compuestas. Mediante el uso de las construcciones y procedimientos, puede producirse nicotina en plantas no productoras de nicotina como *Atropa belladonna* y *Arabidopsis thaliana* y en células, por ejemplo de insectos, hongos y bacterias.

15 **[0105]** Para los fines de esta descripción, una planta o célula no productora de nicotina, como una célula fúngica, puede transformarse con un plásmido que comprende una o más secuencias, cada una de ellas unida operativamente a un promotor. Por ejemplo, un vector ilustrativo puede comprender una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor. Igualmente, el plásmido puede comprender una secuencia de *QPT* unida  
20 operativamente a un promotor y una secuencia de *A622* unida operativamente a un promotor. Alternativamente, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con más de un plásmido. Por ejemplo, una planta o célula no productora de nicotina puede transformarse con un primer plásmido que comprende una secuencia de *QPT* unida operativamente a un promotor, que es distinto de un segundo plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. Por supuesto, el primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la  
25 misma célula.

### *Transformación de plantas*

**[0106]** Una "planta transgénica" se refiere a una planta que comprende una secuencia de ácido nucleico que también está presente de por sí en otro organismo o especie o que se ha optimizado, con respecto al uso de  
30 codones, a partir de otro organismo o especie. Pueden transformarse de diversas maneras conocidas en la técnica las células de plantas angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, o gimnospermas. Por ejemplo, véase Klein y col., *Biotechnology* 4: 583-590 (1993); Bechtold y col., *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199 (1993); Bent y col., *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396 (1986); Paszowski y col., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); Sagi y col., *Plant Cell Rep.* 13: 262-266 (1994). Pueden usarse especies de *Agrobacterium* como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, por  
35 ejemplo, de acuerdo con Nagel y col., *Microbiol. Lett.* 67: 325 (1990). Adicionalmente, las plantas pueden transformarse mediante transformación por *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Mesorhizobium*. Brothoarts y col., *Nature* 433: 629-633 (2005).

40 **[0107]** Por ejemplo, *Agrobacterium* puede transformarse con un vector de expresión en plantas, por ejemplo, por medio de electroporación, después de lo cual dicho *Agrobacterium* se introduce en las células de la planta, por ejemplo, por medio del procedimiento bien conocido de los discos de hoja. Otros procedimientos adicionales para conseguir esto incluyen, pero no se limitan a electroporación, bombardeo de partículas, precipitación con fosfato de calcio y fusión con polietilenglicol, transferencia a granos de polen en germinación, transformación directa (Lorz y  
45 col., *Mol. Genet.* 199: 179-182 (1985)) y otros procedimientos conocidos en la técnica. Si se emplea un marcador de selección, como la resistencia a kanamicina, resulta más fácil determinar qué células se han transformado satisfactoriamente. Los genes marcadores pueden incluirse entre pares de sitios de recombinación reconocidos por recombinasas específicas como cre o flp para facilitar la eliminación del marcador después de la selección. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2004/0143874.

50 **[0108]** Pueden producirse plantas transgénicas sin los genes marcadores mediante el uso de un segundo plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica el marcador, distinto de un primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1*. El primero y el segundo plásmidos o porciones de los mismos se introducen en la misma célula de la planta, de modo que las células de la planta transformadas se identifican por el gen del marcador  
55 seleccionable que se expresa transitoriamente y se obtienen plantas transformadas en las que la secuencia de *A622* o *NBB1* está integrada de manera estable en el genoma y el gen marcador no está integrado de forma estable. Véase la solicitud publicada de los EE. UU. n° 2003/0221213. El primer plásmido que comprende una secuencia de *A622* o *NBB1* puede ser opcionalmente un vector binario con una región de ADN-T constituida en su totalidad por secuencias de ácido nucleico presentes en *N. tabacum* no transgénica natural o una especie de *Nicotiana*

sexualmente compatible.

**[0109]** Se sabe que los procedimientos de transformación mediante *Agrobacterium* expuestos anteriormente son útiles para la transformación de dicotiledóneas. Adicionalmente, de la Pena y col., Nature 325: 274-276 (1987), Rhodes y col., Science 240: 204-207 (1988) y Shimamoto y col., Nature 328: 274-276 (1989) han transformado monocotiledóneas cereales mediante *Agrobacterium*. Véase también Bechtold y col., C.R. Acad. Sci. Paris 316 (1994), que ilustra la infiltración mediante vacío para la transformación por medio de *Agrobacterium*.

**[0110]** Los procedimientos para la regeneración de una planta transgénica a partir de una célula o cultivo transformado varían de acuerdo con la especie de planta, pero se basan en una metodología conocida. Por ejemplo, los procedimientos para la regeneración de plantas de tabaco transgénico son bien conocidos. Se han seleccionado plantas manipuladas por ingeniería genética con un aumento de la expresión de al menos uno de *A622*, *NBB1*, *PMT* y *QPT*. Adicionalmente, las plantas manipuladas por ingeniería genética pueden presentar un aumento de los niveles de nicotina y del rendimiento.

15 *Transformación de células no productoras de nicotina*

**[0111]** Las construcciones de acuerdo con la invención pueden usarse para transformar cualquier célula mediante una técnica de transformación adecuada, como la transformación de células de plantas por medio de *Agrobacterium*, el bombardeo de partículas, la electroporación y la fusión con polietilenglicol o la transfección mediante fosfato de calcio, DEAE-dextrano o lípidos catiónicos.

**[0112]** Las células no productoras de nicotina pueden transformarse con construcciones de ácidos nucleicos de la presente descripción sin el uso de un marcador seleccionable o visible y los organismos transgénicos pueden identificarse mediante la detección de la presencia de la construcción introducida. Por ejemplo puede medirse la presencia de una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico en una célula concreta para determinar si la célula se transformado o transfectado satisfactoriamente. Por ejemplo, y como rutina en la técnica, la presencia de la construcción introducida puede detectarse por PCR u otros procedimientos adecuados para la detección de un ácido nucleico o secuencia polipeptídica específicos. Adicionalmente, las células transformadas pueden identificarse mediante el reconocimiento de diferencias en la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula transformada en comparación con la tasa de crecimiento o una característica morfológica de una célula sin transformar cultivada en condiciones similares. Véase el documento WO 2004/076625.

**[0113]** Para los fines de la presente descripción, se seleccionan células manipuladas por ingeniería genética que expresan *A622* y *NBB1* heterológamente.

#### **Quantificación del contenido de alcaloides nicotínicos**

**[0114]** Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos. De manera similar, las células no productoras de nicotina transformadas se caracterizan por la producción de alcaloides nicotínicos.

**[0115]** Al describir una planta de la invención, la frase "aumento del contenido de nicotina o alcaloides nicotínicos" se refiere a un aumento de la cantidad de alcaloides nicotínicos en la planta o célula en comparación con una planta o célula de control sin transformar. Una "planta con aumento de nicotina" abarca una planta manipulada por ingeniería genética que tiene un aumento del contenido de nicotina superior al 10 % y preferentemente superior al 50 %, 100 % o 200 % del contenido de nicotina de una planta de control de la misma especie o variedad.

**[0116]** Una célula no productora de nicotina transformada satisfactoriamente se caracteriza por la síntesis de alcaloides nicotínicos. Por ejemplo, una célula no productora de nicotina transformada puede producir nicotina, mientras que una célula de control sin transformar no puede.

**[0117]** Un aumento cuantitativo de los niveles de alcaloides nicotínicos puede comprobarse por varios procedimientos como, por ejemplo, por cuantificación basada en cromatografía de gas-líquido, cromatografía líquida de alto rendimiento, radioinmunoensayos y ensayos de inmunoadsorción enzimática. En la presente descripción, los niveles de alcaloides nicotínicos se midieron por cromatografía de gas-líquido, con una columna capilar y un detector de ionización de llama (FDI), según se describe en Hibi y col., Plant Physiology 100: 826-35 (1992).

**Cuantificación del rendimiento**

[0118] Las plantas y células manipuladas por ingeniería genética se caracterizan por un aumento del contenido de alcaloides nicotínicos y del rendimiento. La producción de alcaloides nicotínicos en las plantas manipuladas por ingeniería genética se alcanza preferentemente mediante la expresión de un gen de la ruta de la biosíntesis de nicotina, como *A622* y adicionalmente de manera opcional *NBB1*, *PMT* o *QPT*.

[0119] Al describir una planta de la invención, la expresión “aumento del rendimiento” o “alto rendimiento” se refiere a un aumento en la cantidad de rendimiento de una planta o un cultivo de dicha planta en comparación con una planta de control con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta. Una “planta con aumento del rendimiento” abarca una planta manipulada por ingeniería genética de modo que produce lo mismo como planta o cultivo de dicha planta que una planta con aumento de nicotina o un cultivo de dicha planta, preferentemente más del 110 % y con mayor preferencia más del 125 % del rendimiento de una planta de control de la misma variedad o especie enriquecida en nicotina.

[0120] Un aumento cuantitativo de la eficiencia fotosintética puede determinarse por varios procedimientos como, por ejemplo, mediante la cuantificación de tasas de fotosíntesis como el intercambio gaseoso y la fijación de CO<sub>2</sub> y la fluorescencia de la clorofila. Miyagawa y col., *Plant Cell Physiol.* 41: 311-320 (2000). Las tasas de fotosíntesis pueden cuantificarse también por medición de los niveles de metabolitos y carbohidratos, según se describe en Leegood, *Carbon Metabolism in Photosynthesis and production in a changing environment: afield and laboratory manual* (eds. Hall, Scurlock, Bolhar-Nordenkamp, Leegood y Long) 247-267 (Chapman and Hall, Londres; 1993). Alternativamente, la actividad fotosintética puede calcularse sobre la base de la actividad enzimática, como la actividad de la Rubisco. Portis, A. R., *J. Exp. Bot.* 46: 1285-1291 (1995).

[0121] Por supuesto, un aumento del rendimiento puede determinarse mediante la medición de características más fácilmente apreciables, incluidas, pero sin limitarse a la altura de la planta, el peso, el tamaño de la hoja, el momento de floración, el número de semillas producidas y el peso de las semillas.

**Productos con aumento de nicotina.**

[0122] La presente invención proporciona una planta manipulada por ingeniería genética que presenta un aumento de los niveles de nicotina, así como una célula no productora de nicotina manipulada por ingeniería genética que produce nicotina o compuestos relacionados, en que dicha célula deriva de un organismo que no produce nicotina. A partir de una planta manipulada por ingeniería genética semejante pueden obtenerse diversos productos. Igualmente, pueden obtenerse productos a partir de células manipuladas por ingeniería genética para la producción de nicotina o compuestos relacionados.

**Plantas resistentes a herbívoros**

[0123] La nicotina sirve como un plaguicida natural que ayuda a proteger a las plantas de tabaco del daño producido por plagas. Se ha demostrado que el tabaco mejorado convencionalmente o transgénico de bajo contenido de nicotina es más susceptible al daño por insectos. Legg, P. D. y col., *Can. J. Cyto.*, 13: 287-291 (1971); Voelckel, C. y col., *Chemoecology* 11: 121-126 (2001); Steppuhn, A. y col., *PLoS Biol.* 2(8): e217: 1074-1080 (2004). Mediante el uso de los procedimientos y construcciones desvelados, pueden producirse plantas con aumento de nicotina que presentan un aumento de la resistencia al daño por insectos u otras plagas. De manera similar, puede obtenerse un aumento de la resistencia a plagas en plantas no productoras de nicotina, como *A. belladonna* y *A. thaliana*, manipuladas por ingeniería genética de acuerdo con la presente invención para producir nicotina.

**Productos con aumento de nicotina**

[0124] Las construcciones y procedimientos de la invención pueden usarse para producir, por ejemplo, cigarrillos, cigarros y otros productos tradicionales de tabaco como rapé y snus. Adicionalmente, pueden producirse cigarrillos con aumento de nicotina que presentan una exposición reducida a componentes del humo como alquitrán, pero proporcionan un suministro de nicotina similar o mayor que los cigarrillos convencionales.

[0125] En la presente descripción, un producto de tabaco con aumento de nicotina puede estar en forma de tabaco de hoja, tabaco picado, tabaco cortado en hebras, tabaco molido, tabaco reconstituido, tabaco expandido o inflado y fracciones de tabaco que incluyen, por ejemplo, nicotina. Un producto de tabaco con aumento de nicotina puede incluir cigarrillos, cigarros, tabaco de pipa y cualquier forma de tabaco sin humo como rapé, snus o tabaco de

mascar.

**[0126]** En la técnica del tabaco es común la mezcla de diferentes tipos o cultivares de tabaco dentro de un producto de tabaco como un cigarrillo. Por lo tanto, se apreciará que el tabaco con aumento de nicotina podría 5 mezclarse en cualquier proporción con un tabaco sin transformar para obtener cualquier nivel deseado de contenido de nicotina, hasta el contenido de nicotina del tabaco con aumento de nicotina utilizado, para fabricar un producto de tabaco.

**[0127]** Los cigarrillos con aumento de nicotina son particularmente ventajosos porque existen estudios que 10 demuestran que cuando se aumenta la nicotina, los fumadores inhalan menos alquitrán y monóxido de carbono. Véase Armitage y col., *Psychopharmacology* 96: 447-453 (1988); Fagerström, *Psychopharmacology* 77: 164-167 (1982); Russell, *Nicotine and Public Health* 15: 265-284 (2000) y Woodman y col., *European Journal of Respiratory Disease* 70: 316-321 (1987).

**[0128]** El humo de los cigarrillos en una mezcla extremadamente compleja de más de 4.000 compuestos 15 diferentes. Green y Rodgman, *Recent Advances in Tobacco Science* 22: 131-304 (1996); Informe del IOM, página 9 del resumen ejecutivo. El humo de los cigarrillos está compuesto de dos fases: una fase particulada, denominada comúnmente "alquitrán" o materia particulada total, y una fase de vapor que contiene gases y compuestos semivolátiles. Una definición común de "alquitrán" es el "humo seco sin nicotina" o la "materia particulada seca sin 20 nicotina" (NFDPM) capturados por una almohadilla de Cambridge cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de fumar. Más específicamente, el "alquitrán" es la materia particulada total aislada del humo, con exclusión del agua y la nicotina. El alquitrán constituye menos del diez por ciento del peso del humo del cigarrillo. Sin embargo, el alquitrán es el componente que contiene la mayor parte de los compuestos más dañinos del humo.

**[0129]** Los procedimientos analíticos combinados con ensayos biológicos sensibles han conducido a la 25 identificación de 69 carcinógenos en el humo del tabaco. Véase *THE CHANGING CIGARETTE: CHEMICAL STUDIES AND BIOASSAYS*, capítulo 5, *Smoking and Tobacco Control Monograph* n° 13 (Publicación del NIH n° 02-5074, octubre de 2001). Sin embargo, resulta claro para los investigadores que no todos los componentes del humo de los cigarrillos tienen la misma toxicidad. Notablemente, el primer informe del Surgeon General de los EE. UU. 30 sobre el tabaco en 1964 llegó a la conclusión de que la nicotina probablemente no era tóxica en los niveles inhalados, con la implicación de que la fuente principal de gratificación farmacológica para los fumadores no presentaba un riesgo inmediato. El informe del General Surgeon de 1964 afirmaba en la página 74 que no hay pruebas aceptables de que una exposición prolongada a la nicotina creara cambios funcionales peligrosos de naturaleza objetiva ni enfermedades degenerativas.

**[0130]** De hecho, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. permite la venta de 35 productos sustitutivos de nicotina como parches y chicle para uso en los tratamientos para dejar de fumar. Estos productos pueden suministrar más nicotina en un día que un paquete de cigarrillos. En la página 167 del informe del IOM se afirma que numerosos estudios sobre nicotina sugieren que no es probable que esta sea un agente 40 cancerígeno en humanos o, cuánto más, que su carcinogenicidad sería insignificante en comparación con la de otros componentes del tabaco. Es decir, que la consideración de la nicotina como agente carcinógeno, si acaso, es insignificante en comparación con el riesgo de otros constituyentes del tabaco.

**[0131]** Los cigarrillos se evalúan generalmente mediante los métodos de la máquina de fumar de la Comisión 45 Federal del Comercio (FTC) (en los EE. UU.) o la Organización Internacional de Normalización (ISO) que determinan, por ejemplo, la cantidad de alquitrán y nicotina generada cuando un cigarrillo se fuma en una máquina de acuerdo con condiciones estándar. Véanse Pillsbury y col., *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* (1969); ISO: 4387 (1991). En general, la mayoría de los cigarrillos comerciales producen aproximadamente de 10 a 15 partes de "alquitrán" por cada parte de nicotina, medidas en miligramos, según se analiza en la solicitud PCT WO 50 2005/018307.

**[0132]** Muchas autoridades sanitarias creen que el régimen actual de las máquinas de fumar FTC/ISO es 55 imperfecto porque estas metodologías no tienen en cuenta el comportamiento del fumador humano, impulsado fundamentalmente por la búsqueda de nicotina. En otras palabras, estos procedimientos no consideran el fumar compensatoriamente. El fumar compensatoriamente o la compensación, como también se denomina, significa esencialmente fumar en exceso (fumar más intensivamente), debido a la menor presencia de nicotina en el humo del tabaco o fumar en defecto (fumar menos intensivamente) debido al aumento de la presencia de nicotina. Véase Benowitz, N. *Compensatory Smoking of Low Yield Cigarettes*, Monografía 13 del NCI.

**[0133]** Actualmente se están evaluando nuevos procedimientos de máquinas de fumar, especialmente aquellos que consideran fumar compensatoriamente marcas de baja producción. Un ejemplo es un procedimiento que implica el ajuste de los parámetros al fumar, de modo que las marcas con menores producciones de nicotina según el ISO se fuman en la máquina con mayor intensidad. Kozlowski y O'Connor Lancet 355: 2159 (2000). Otros procedimientos propuestos miden la producción de toxinas con respecto a unidades de nicotina o para una producción de nicotina "objetivo" definida. Esto se consigue, por ejemplo, por variación sistemática del volumen de bocanada y el intervalo de bocanadas y el bloqueo de los orificios de ventilación hasta alcanzar la producción de nicotina objetivo. Los cigarrillos pueden evaluarse entonces según el esfuerzo requerido para conseguir la producción de nicotina objetivo, así como según el suministro de toxinas para tal producción. Los consumidores se beneficiarían de estos procedimientos de máquinas de fumar, dado que podrían llevarse a cabo comparaciones de toxinas específicas entre marcas diferentes.

**[0134]** Algunos estudios han sugerido que muchos fumadores inhalan la misma cantidad de humo con la mayoría de los cigarrillos "light" y "ultra-light" que con los cigarrillos de sabor pleno (Gori y Lynch, Regulatory Toxicology and Pharmacology 5: 314-326). Los fumadores pueden compensar o fumar los cigarrillos de menor producción de humo (según el procedimiento de la FTC o el ISO) de manera más agresiva (que los cigarrillos de mayor producción) con el fin de obtener el deseado impacto de nicotina y la sensación de humo en la boca, que importantes propiedades sensoriales. Rose J. E. "The role of upper airway stimulation in smoking," en Nicotine Replacement: A Critical Evaluation, págs. 95-106, 1988.

**[0135]** La manera en que un fumador puede compensar incluye la frecuencia de bocanadas por cigarrillo y el volumen de inhalación de humo en dichas bocanadas, el tiempo que se retiene el humo inhalado antes de exhalarlo, el número de cigarrillos fumados durante un periodo de tiempo específico y el porcentaje de cada cigarrillo que se fuma (hasta donde se fuma el cigarrillo).

**[0136]** Cuando el porcentaje de nicotina por unidad de volumen de humo inhalado aumenta, muchos fumadores pueden compensar e inhalar menos humo. Gori G. B., Virtually Safe Cigarettes. Reviving an opportunity once tragically rejected. IOS Press. Ámsterdam, (2000). Cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el tabaco de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo. Más específicamente, cuanto mayor es el porcentaje de nicotina en el relleno de un cigarrillo, mayor es el porcentaje de nicotina en el humo del cigarrillo. "Relleno" significa cualquier material fumable que se enrolla dentro de un cigarrillo o dispositivo similar a un cigarrillo e incluye (a) todos los tabacos, incluidos, pero sin limitarse a los tabacos reconstituidos y expandidos, (b) cualquier sustitutivo distinto del tabaco que puede acompañar a (a), (c) envoltorios de tabaco, (d) otros aditivos, incluidos saborizantes que se añaden a (a), (b) o (c). Un dispositivo similar a un cigarrillo es cualquier dispositivo destinado específicamente al suministro de nicotina a través de un aerosol de "humo" alternativo formado por el calentamiento de materiales de tabaco. Lo característico de tales dispositivos es que presentan un alto contenido de glicerina o un sustitutivo de glicerina con una combustión pirolítica mínima o nula. Cuando se calienta la glicerina, esta se vaporiza rápidamente y forma un aerosol que puede inhalarse y que es muy similar en aspecto y sensación al humo de los cigarrillos convencionales.

**[0137]** Por lo tanto, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o en un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes (incluidos, pero sin limitarse al tipo de filtro, el papel del cigarrillo, incluida su porosidad, la envoltura del filtro y el papel boquilla utilizados y el grado de ventilación del filtro), tendrá que duplicarse aproximadamente para una duplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Además, el contenido de nicotina del relleno de tabaco contenido en un cigarrillo o un dispositivo similar a un cigarrillo, cuando todos los demás factores se mantienen constantes, tendrá que triplicarse aproximadamente para una triplicación correspondiente de la nicotina en el humo de un cigarrillo corriente. Los cálculos en esta sección se refieren a nicotina protonada en el humo corriente de un cigarrillo con el aumento descrito de los niveles de nicotina y no a nicotina "libre" o "volátil".

**[0138]** En una realización preferida de la invención se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende una planta de tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es de hasta el doble. En otra realización preferida de la presente invención se fabrica un cigarrillo de exposición reducida que comprende tabaco con aumento de nicotina, en que el aumento de nicotina es superior al doble.

**[0139]** El programa de ensayo de variedades llevado a cabo por el Servicio de Investigación Agrícola de la Universidad del Estado de Carolina del Norte evalúa las líneas de mejora a través del *Programa Regional de Mínimos Estándares* y las líneas comerciales a través del *Ensayo Oficial de Variedades de Carolina del Norte* (NCOVT). La concentración total de alcaloides de variedades comerciales curadas al humo descrita en la media de

tres años del NCOVT, desde 2001 a 2003, varía del 2,45 al 3,17 %. Smith y col., "Variety Information," capítulo 3 en: NORTH CAROLINA OFFICIAL VARIETY TEST (2004), tabla 3.1. La media de tres años de la concentración total de alcaloides fue del 2,5 % para K-326, el cultivar utilizado en los ejemplos 4-6 y 9-14. Para medir el contenido de alcaloides totales de los cultivares de tabaco en el NCOVT anterior y con el fin de medir el contenido de alcaloides espectrométrico. Grupo de Asesoramiento Técnico de los EE. UU., ISO/TC 126 - Tobacco and tobacco products: ISO/DIS 2881. Según se describe en este documento, incluidas las figuras, parece que algunas plantas con aumento de nicotina tiene la capacidad de al menos duplicar o incluso más que triplicar la acumulación de nicotina de los controles naturales K326. Igualmente, en los ejemplos 4 a 6, la sobreexpresión de *NBB1* y *A622* produce un aumento de nicotina del doble o incluso del triple en comparación con los controles naturales.

**[0140]** El "curado" es el proceso de envejecimiento que reduce la humedad y provoca la destrucción de la clorofila, lo que da lugar a hojas de tabaco con un color dorado, y por el que el almidón se convierte en azúcar. Por lo tanto, el tabaco curado tiene mayor contenido de azúcares reductores y menor contenido de almidón que la hoja verde recolectada. El "tabaco curado al humo" se refiere a un procedimiento de secado de las plantas de tabaco en un granero ventilado con calor y se caracteriza por un color único, un alto contenido de azúcares reductores, un cuerpo de medio a pesado y excepcionalmente suave al fumar. Bacon y col., Ind. Eng. Chem. 44: 292 (1952).

**[0141]** Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) son una clase de carcinógenos que se forman predominantemente durante el curado y el procesamiento. Hoffman, D. y col., J. Natl. Cancer Inst. 58: 1841-4 (1977); Wiernik, A. y col., Recent Adv. Tob. Sci, 21: 39-80 (1995). Las TSNA como 4-(*N*-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), *N*'-nitrosornicotina (NNN), *N*'-nitrosoanatabina (NAT) y *N*'-nitrosoanabasina (NAB) se forman por la *N*-nitrosación de nicotina y otros alcaloides secundarios de *Nicotiana*, como nornicotina, anatabina y anabasina.

**[0142]** Las plantas con aumento de nicotina pueden contener más nitrosaminas, ya que existe una correlación positiva entre el contenido de alcaloides en tabaco y la acumulación de TSNA. Por ejemplo, se ha encontrado un coeficiente de correlación significativa de 0,76 entre anatabina y NAT. Djordjevic y col., J. Agric. Food Chem., 37: 752-56 (1989). Sin embargo, las patentes de los EE. UU. n° 5.803.081, n° 6.135.121, n° 6.805.134, n° 6.895.974 y n° 6.959.712 y las solicitudes publicadas de los EE.UU. 2005/0034365, 2005/0072047, 2005/0223442, 2006/0041949, así como la solicitud PCT publicada WO 2006/091194 y otras describen metodología para reducir las nitrosaminas específicas del tabaco que puede aplicarse a un producto de tabaco que utiliza la invención sujeto.

**[0143]** Por consiguiente, se dan a conocer construcciones y metodología para la producción de cigarrillos y otros productos de tabaco que contienen mayores niveles de nicotina. Un cigarrillo de exposición reducida deseable debería suministrar a un fumador el nivel deseado de nicotina por cigarrillo de la manera lo más eficiente posible mientras mantiene un sabor aceptable. Véase el documento WO 05/018307.

#### **Tabaco reconstituido, tabaco expandido y mezcla**

**[0144]** El tabaco con aumento de nicotina puede usarse también para producir láminas de tabaco reconstituido (Recon) y tabaco expandido o tabaco inflado. El Recon puede producirse a partir de los siguientes: polvo de tabaco, tallos, pequeñas partículas de hojas, otros productos secundarios del procesamiento del tabaco y la fabricación de cigarrillos y en algunos casos directamente la hoja entera. El proceso Recon, que varía según el fabricante, es muy semejante al proceso típico de fabricación de papel y supone el procesamiento de diversas fracciones de tabaco y el cortado posterior de las láminas de Recon en una forma y tamaño que se asemeja al tabaco de los cigarrillos (tabaco cortado en hebras).

**[0145]** Además, el tabaco con aumento de nicotina puede usarse de acuerdo con la presente invención para producir tabaco expandido, también conocido como tabaco inflado, que es un componente importante en muchas marcas de cigarrillos. El tabaco expandido se prepara a través de la expansión de gases adecuados, en lo que el tabaco se "infla", lo que resulta en una menor densidad y mayor capacidad de relleno, lo que a su vez, reduce el peso del tabaco usado en los cigarrillos. Al usar el tabaco con aumento de nicotina como material de partida, los cigarrillos fabricados con el tabaco expandido resultante producirán menores proporciones de sustancias químicas tóxicas, como alquitrán y monóxido de carbono, con respecto a nicotina.

**[0146]** El tabaco expandido con aumento de nicotina, el Recon con aumento de nicotina y el tabaco cortado en hebras con aumento de nicotina pueden mezclarse en cualquier proporción entre los tres o con cualquier proporción de tabaco expandido sin transformar, Recon sin transformar o tabaco cortado en hebras sin transformar para producir relleno de cigarrillos con un contenido de nicotina diverso. Cualquiera de estas mezclas se incorpora

después en el proceso de fabricación de cigarrillos de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica.

**[0147]** También se fabrican otros productos de tabaco distintos de los cigarrillos con el tabaco con aumento de nicotina manipulado por ingeniería genética, mediante el uso de cualquier material de plantas de tabaco descrito en este documento de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. En una realización, se fabrican productos de tabaco que comprenden material obtenido de plantas de tabaco con aumento de nicotina. El mayor contenido de nicotina puede ser de hasta más del triple del contenido de los cultivares naturales.

## 10 Enzimas y análogos de alcaloides nicotínicos

**[0148]** Además de los productos de tabaco tradicionales, como cigarrillos y tabaco de mascar, la presente descripción proporciona metodología para la producción de nicotina y análogos de nicotina, así como enzimas para la síntesis de nicotina y análogos de nicotina. Estos compuestos pueden ser producidos por plantas productoras de nicotina y células no productoras de nicotina manipuladas por ingeniería genética, así como en un sistema sin células/*in vitro*.

**[0149]** Dado que existen estudios recientes que sugieren un papel para los receptores de nicotina en el tratamiento de diversas dolencias y trastornos, como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la disfunción de los sistemas nerviosos central y autónomo, así como adicciones, existe la necesidad de fuentes de ligandos para receptores de nicotina. Por ejemplo, los procedimientos y construcciones pueden usarse para la producción de alcaloides nicotínicos. Se ha demostrado que cultivos de raíces capilares transgénicas que expresan *PTM* en exceso proporcionan un medio eficaz para la producción comercial a gran escala de escopolamina, un alcaloide tropánico de importancia farmacéutica. Zhang y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101: 6786-91 (2004). Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de alcaloides nicotínicos en cultivos de raíces capilares de tabaco mediante la expresión de al menos uno de *A622* y *NBB1*. Igualmente, la presente descripción contempla sistemas de cultivos celulares como cultivos bacterianos o de células de insectos para la producción de cantidades a gran escala o comerciales de nicotina mediante la expresión de *A622* y *NBB1*.

**[0150]** Adicionalmente, pueden prepararse productos directamente mediante el uso de la actividad de las enzimas *NBB1* y *A622*. Por ejemplo, pueden usarse enzimas *NBB1* y *A622* recombinantes para la síntesis o síntesis parcial de alcaloides nicotínicos o análogos de alcaloides nicotínicos. Por consiguiente, pueden producirse cantidades a gran escala o comerciales de *A622* y *NBB1* por diversos procedimientos que incluyen la extracción de la enzima recombinante de una planta, célula o sistema de cultivo manipulados por ingeniería genética, incluidos, pero sin limitarse a cultivos de raíces capilares, cultivos de células de insectos, bacterias, hongos, plantas, algas y mamíferos o *in vitro*.

### EJEMPLO 1: Identificación de *NBB1* como gen regulado por los locus *NIC*

**[0151]** Una micromatriz de ADNc preparada a partir de una colección de ADNc derivada de *Nicotiana sylvestris*, véase Kato y col., Proc. Japan Acad. 79, serie B: 151-54 (2003), se usó para buscar nuevos genes controlados por los locus *NIC* reguladores de la biosíntesis de nicotina.

**[0152]** Los ADNc de *N. sylvestris* se amplificaron por PCR y se aplicaron sobre portaobjetos con un recubrimiento especular (tipo 7 star, Amersham) mediante un aplicador de micromatrices Lucidea de Amersham. El ADN se inmovilizó en la superficie del portaobjetos por entrecruzamiento con UV (120 mJ/m<sup>2</sup>). Se cultivaron 21 plántulas de *N. tabacum* Burley (tipo natural (WT) y *nic1nic2*) en ½x medio B5, enriquecido con sacarosa al 1,5 % (peso normalizado) y goma de gelano al 0,35 % (peso normalizado) (Wako) en recipientes Agriplot (Kirin).

**[0153]** Se recolectaron las raíces de plántulas de ocho semanas, que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. A partir de las raíces congeladas se aisló el ARN total mediante el kit Plant RNeasy Mini (Qiagen) y el ARNm se purificó con el kit para mini-preparaciones de ARNm GenElute (Sigma). El ADNc se sintetizó a partir de 0,4 µg del ARNm purificado con el kit para micromatrices LabelStar (Qiagen) en presencia de Cy3 o Cy5-dCTP (Amersham). La hibridación del ADNc con los portaobjetos con las micromatrices y los lavados tras la hibridación se realizaron con una máquina de hibridación Lucidea SlidePro (Amersham). Las micromatrices se examinaron mediante un escáner FLA-8000 (Fujifilm). La intensidad de la señal en las imágenes de las micromatrices obtenidas se cuantificó con el programa ArrayGauge (Fujifilm). Las sondas de ADNc del tabaco natural y del tabaco *nic1nic2* se marcaron con Cy3 y Cy5 en combinaciones de pares recíprocos. Las señales de hibridación se normalizaron teniendo en cuenta la intensidad total de la señal de los colorantes. Se

identificaron los clones de ADNc que hibridaron con las sondas naturales con una intensidad de más del doble en comparación con las sondas *nic1nic2* y estos incluyeron *NBB1*.

5 **[0154]** Un ADNc de *NBB1* de longitud completa se obtuvo por amplificación RACE de los extremos 5' y 3' a partir de ARN total de *N. tabacum* mediante un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech). El ADNc de *NBB1* de longitud completa resultante se clonó en el vector pGEM-T (Promega) para dar lugar a pGEMTNBB1cDNAfull.

10 **[0155]** La secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de *NBB1* se determinó en las dos hebras mediante un analizador genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems) y un kit de secuenciación de ciclo BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). El ADNc de *NBB1* de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia proteínica incluye un motivo de unión a FAD. En el extremo N se encuentra un potencial péptido señal vacuolar.

### 15 EJEMPLO 2: caracterización de *NBB1*

**[0156]** La expresión de *NBB1* en plantas de tabaco se investigó por análisis de transferencia Northern.

20 **[0157]** Se cultivaron *in vitro* plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21 (abreviada a continuación como WT) y líneas mutantes, en las cuales se habían introducido las mutaciones *nic1*, *nic2* o ambas *nic1* y *nic2* en el fondo genético Burley 21, durante dos meses a 25 °C con 150/1 mol de fotones/m<sup>2</sup> de luz (16 h de luz, 8 h de oscuridad) en ½x medio B5 con sacarosa al 3 % y goma de gelano al 0,3 %. Las plantas se trataron con vapor de metiljasmonato mediante la adición de 0,5 ml de metiljasmonato 100 µM a un recipiente Agripot (Kirin, Tokio, Japón) con una capacidad para medio sólido de 80 cm<sup>3</sup> y una capacidad de gas de 250 cm<sup>3</sup> que contenía las plantas. Los  
25 momentos de tratamiento se fijaron a 0 h y 24 h. Se recogieron las partes de las raíces y las hojas (hojas 2<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> de una planta con un total de siete a diez hojas) de las plantas, que inmediatamente se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido.

30 **[0158]** El ARN se extrajo mediante un kit RNeasy Midi (Qiagen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Sin embargo, se añadió polivinilpirrolidona hasta una concentración del 1 % al tampón RL T del kit de Qiagen. La operación de la columna se llevó cabo dos veces para aumentar la pureza del ARN.

35 **[0159]** La transferencia de ARN se realizó de acuerdo con los procedimientos indicados por Sambrook y Russell (Sambrook, J. y col., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 7 (2001)).

**[0160]** Como molde para la sonda se usó el fragmento de secuencia desde 1.278 pb hasta el final (1.759 pb) de la secuencia nucleotídica de *NBB1* (SEQ ID NO: 1). El molde se preparó por amplificación del clon de ADNc por PCR mediante los cebadores siguientes:

40 cebador 1: GGAAACTAACAACGGAATCTCT

cebador 2: GATCAAGCTATTGCTTTCCCT

45 **[0161]** La sonda se marcó con <sup>32</sup>P mediante un kit de marcaje Bcabeat (Takara) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridación se llevó a cabo con el tampón ULTRAhyb (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

50 **[0162]** La sonda de *PTM* se preparó a partir de una secuencia de *PTM* clonada en el vector pcDNAII en *E. coli* (Hibi y col., 1994). El plásmido se extrajo y purificó de *E. coli* mediante un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), se trató con las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III por procedimientos ordinarios y el ADN digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 1,5 kb se recogieron mediante el kit de extracción para geles QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN recogidos se marcaron con <sup>32</sup>P por los mismos procedimientos usados para la sonda de *NBB1* y se hibridaron.

55 **[0163]** Como muestra la figura 1, *NBB1* y *PMT* tienen el mismo patrón de expresión en plantas de tabaco. La prueba de que *NBB1* está implicado en la biosíntesis de nicotina es que, al igual que *PMT*, *NBB1* está bajo el control de los genes *NIC* y muestra un patrón de expresión similar al de *PMT*.

### EJEMPLO 3: análisis filogenético de *NBB1*

**[0164]** El polipéptido NBB1 tiene un 25 % de identidad y un 60 % de homología con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (BBE). Dittrich y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 9969-73 (1991). Un alineamiento del polipéptido NBB1 con EcBBE se muestra en la figura 2.

5

**[0165]** Se construyó un árbol filogenético usando las secuencias del polipéptido NBB1 y de polipéptidos de plantas similares a BBE, basado en Carter y Thornburg, Plant Physiol. 134: 460-69 (2004). El análisis filogenético se realizó por el procedimiento de unión de vecinos con el programa CLUSTAL W. Los números indican valores de iniciales de 1.000 réplicas. Las secuencias usadas fueron EcBBE, BBE de amapola de California (n° de acceso de GenBank AFOOS655); PsBBE, probable reticulina-oxidasa de adormidera (*Papaver somniferum*) (AF025430); BsBBE, BBE de agracejo (*Berberis stolonifera*) (AF049347); VuCPRD2, proteína inducida por la sequía de caupí (*Vigna unguiculata*) (AB056448); nectarina V de *Nicotiana* sp. (AFS034411AF503442); HaCHOX, carbohidrato-oxidasa de girasol (*Helianthus annuus*) (AF472609); LsCHOX, carbohidrato-oxidasa de lechuga (*Lactuca sativa*) (AF472608); y 27 genes de *Arabidopsis* (Atlg01980, Atlg11770, Atlg26380, Atlg26390, Atlg26400, Atlg26410, Atlg26420, Atlg30700, Atlg30710, Atlg30720, Atlg30730, Atlg30740, Atlg30760, Atlg34575, At2g34790, At2g34810, At4g20800, At4g20820, At4g20830, At4g20840, At4g20860, At5g44360, At5g44380, At5g44390, At5g44400, At5g44410 y At5g44440).

**[0166]** Los resultados se muestran en la figura 3. Las tres BBE conocidas forman un clado separado y están subrayadas e indicadas como "BBE verdaderas". La secuencia de NBB1 no es muy similar a ninguna de las BBE ni a las proteínas similares a BBE y se separa de las otras secuencias en la base del árbol. La única otra proteína similar a BBE descrita del género *Nicotiana*, nectarina V, una proteína descrita en el néctar del híbrido ornamental de *Nicotiana langsdorffii* x *N. sanderae*, Carter y Thornburg (2004), se agrupa con la proteína inducida por la sequía de caupí y varias proteínas potencialmente similares a BBE de *Arabidopsis*. Dado que el néctar del tabaco ornamental carece de alcaloides y la nectarina V tiene actividad de glucosa-oxidasa, se concluyó que la nectarina V está implicada en la defensa contra microorganismos en las flores y no es probable que tenga ningún papel en la síntesis de alcaloides (misma referencia).

#### **EJEMPLO 4: sobreexpresión de NBB1 en raíces capilares de tabaco**

30

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1*

**[0167]** Se amplificó un fragmento attB-NBB1 por PCR con el vector pGEMTNBB1cDNAfull del ejemplo 1 como molde y dos pares de cebadores; un par para la amplificación específica del gen *NBB1* (cebadores específicos del gen) y otro par para añadir las secuencias attB (cebadores adaptadores). Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-NBB1, se creó por una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, attB-NBB1, y pDONR221 (Invitrogen).

Cebadores específicos del gen

40

NBB1-attB1 5' AAAAAGCAGGCTCACCATGTTTCCGCTCATAATTCTG

NBB1-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTCACTACTGCTATACTTGTGC

45

Cebadores adaptadores

adaptador attB1 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

50 adaptador attB2 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

*Descripción de pTobRD2-DEST*

**[0168]** La región promotora TobRD2 (SEQ ID NO: 5 en el documento WO9705261), de 1.031 pb, se amplificó usando el ADN genómico de Burley 21 como molde y los cebadores específicos del promotor TobRD2 y después se digirió con *HindIII* y *XbaI*.

**[0169]** Cebadores específicos del promotor TobRD2:

TobRD2-01F 5' AAAGCTTGGAAACATATTTCAATACATTGTAG

se subraya el sitio *HindIII*

5 TobRD2-02R 5' TCTAGATTCTACTACTATTTTATAAGTG

se subraya el sitio *XbaI*

**[0170]** El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* de pBI101H (suministrado por Dr. Shuji Yokoi de NAIST; ref.: Molecular Breeding 4: 269-275, 1998), lo que resultó en el plásmido pTobRD2-BI101H. Una casete para el sistema GATEWAY, que contenía los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, se clonó entre los sitios *XbaI* y *SacI* del vector binario pTobRD2-BI101H para producir el vector binario pTobRD2-DEST, que tiene una región de ADN-T que contiene una casete de expresión del gen *NPTII* (promotor Nos - ORF II de neomicina-fosfotransferasa - terminador Nos) y una casete de expresión del gen *HPT* (promotor CaMV35S - ORF de higromicina-fosfotransferasa - terminador Nos) como marcadores de selección flanqueando al promotor TobRD2 adyacente a una casete de GATEWAY. En la figura 4A se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-DEST.

**[0171]** La ORF de *NBB1* se transfirió mediante una reacción LR desde el vector pDONR221-NBB1 al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST, diseñado para expresar una ORF clonada bajo el control del promotor TobRD2. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T del vector de expresión final pTobRD2-NBB1ox.

#### *Producción de raíces capilares transgénicas*

**[0172]** El vector binario pTobRD2-NBB1ox se introdujo por electroporación en la cepa 15834 de *Agrobacterium rhizogenes*. Se transformaron plantas naturales de *Nicotiana tabacum* cv. K326 mediante *A. rhizogenes* por el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según se describe en Kanegae y col., Plant Physiol. 105:2: 483-90 (1994). Como marcador de selección para las líneas transformadas por pTobRD2-NBB1ox (líneas TN) se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio B5). *A. rhizogenes* natural se usó para producir líneas de raíces capilares de control (WT). Las raíces capilares de tabaco se cultivaron en medio B5 líquido a 27 °C en condiciones de oscuridad durante dos semanas y después se recolectaron.

#### *Procedimiento para el análisis de la expresión*

**[0173]** Los niveles de expresión de la proteína NBB1 se analizaron por inmunotransferencia. Las raíces capilares se congelaron en nitrógeno líquido e inmediatamente se homogeneizaron con un mortero y mano en un tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ditiotretitol 200 mM. Después de la centrifugación de los homogeneizados, las proteínas en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con un suero de conejo dirigido contra NBB1. Los procedimientos detallados han sido descritos previamente. Shoji y col., Plant Mol. Biol., 50: 427-440 (2002). El análisis de inmunotransferencia con el antisuero contra NBB1 muestra un aumento de los niveles de la proteína NBB1 para las líneas de raíces capilares transgénicas TN9 y TN17. Véase la figura 5A.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[0174]** Las raíces capilares transgénicas se cultivaron durante dos semanas, se recolectaron y se liofilizaron. A 19 mg de la muestra liofilizada se le añadieron 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N. Esta suspensión se sometió a ultrasonidos durante 15 min y se filtró. Se añadió hidróxido de amonio (0,1 ml de NH<sub>3</sub> al 28 %; Wako) a 1 ml del filtrado y la mezcla se centrifugó durante 10 min a 15.000 rpm. Una muestra del sobrenadante (1 ml) se cargó en una columna Extrelut-1 (Merck) y se dejó reposar durante 5 min. Los alcaloides se eluyeron con 6 ml de cloroformo. La fracción de cloroformo eluida se secó a presión reducida y 37 °C en un evaporador (concentrador Taitec TC-8). La muestra seca se disolvió en 50 µl de una disolución de etanol que contenía dodecano al 0,1 %. Para el análisis de las muestras se usó un cromatógrafo de gases (GC-14B, Shimadzu) equipado con una columna capilar (columna Rtx-5Amine, Restec) y un detector FID. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La temperatura de inyección y del detector fue de 300 °C. Se inyectó una muestra de 1 µl de la preparación de alcaloides purificados y el contenido de alcaloides se midió por el procedimiento del estándar interno.

[0175] Las líneas de raíces capilares transformadas con el vector para la sobreexpresión de NBB1, pTobRD2-NBB1ox, (TN9, TN17) muestran un aumento de los niveles de nicotina y nornicotina en comparación con las líneas de raíces capilares naturales. Véase la figura 6.

5

#### **EJEMPLO 5: Sobreexpresión de A622 en raíces capilares de tabaco**

*Preparación de una construcción para la sobreexpresión de A622*

10 [0176] Se amplificó un fragmento attB-A622 con el vector pcDNAII-A622, según Hibi y col, Plant Cell 6: 723-35 (1994), como molde, los cebadores específicos de A622 siguientes y los cebadores adaptadores según se describen anteriormente en el ejemplo 4.

Cebadores específicos del gen

15

A622-attB1 5' AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTTGTATCAGAGAAAAGCA

A622-attB2 5' AGAAAGCTGGGTCCTAGACAAATTTGTTGTAGAACTCGTCCG

20 [0177] El fragmento de A622 amplificado se clonó en el vector pDONR221 mediante una reacción BR, lo que resultó en pDONR-A622, y después el fragmento de A622 se transfirió de pDONR-A622 a pTobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión resultante se denominó pTobRD2-A622ox. En la figura 4C se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox.

25 *Producción de raíces capilares transgénicas*

[0178] Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox se denominaron líneas TA y se cultivaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4.

30

*Procedimiento para el análisis de la expresión*

[0179] Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4, excepto porque para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21 transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 demostraron tener mayores niveles de la proteína A622. Véase la figura 5B.

35

*Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

40

[0180] Los alcaloides del tabaco se extrajeron, purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las líneas de raíces capilares TA11, TA14 y TA21, transformadas con el vector para la sobreexpresión de A622 presentaron mayores niveles de nicotina y nornicotina. Véase la figura 6.

45 **EJEMPLO 6: sobreexpresión de NBB1 y A622 en raíces capilares de tabaco**

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de A622 y NBB1*

[0181] Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas A622 y NBB1 a partir de un único ADN-T, las casetes de expresión TobRD2-A622 y TobRD2-NBB1 se clonaron en tándem en un vector binario. La casete TobRD2-A622 se escindió de pTobRD2-A622ox con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-NBB1ox. El vector resultante para la sobreexpresión de ambos NBB1 y A622 se denominó pTobRD2-A622ox-NBB1ox. En la figura 4B se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox.

50

55

*Producción de raíces capilares transgénicas*

[0182] Se transformaron plantas naturales de *N. tabacum* cv. K326 con *A. rhizogenes* 15834 que contenía el vector pTobRD2-A622ox-NBB1ox, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Las raíces capilares

transgénicas con el ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox se denominaron líneas TNA y se cultivaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4.

*Procedimiento para el análisis de la expresión*

5

**[0183]** Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4, excepto porque para la detección de las proteínas se usó suero de ratón dirigido contra A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1. La línea de raíces capilares TNA8, muestra un aumento del nivel de expresión de ambas proteínas NBB1 (véase la figura 5A) y A622 (véase la figura 5B) en comparación con las líneas de raíces capilares naturales.

10

*Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[0184]** Los alcaloides del tabaco se extrajeron de la línea de raíces capilares TNA8, se purificaron y analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Los niveles de nicotina y normicotina son mayores en la línea TNA8 que en las líneas de raíces capilares naturales. (Véase la figura 6).

15

**EJEMPLO 7: plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan la proteína A622.**

**[0185]** *Atropa belladonna* produce los alcaloides tropánicos hiosciamina y escopolamina, que derivan del catión N-metilpirrolinio, pero no contiene alcaloides nicotínicos, posiblemente debido a la ausencia de los genes *NBB1* y *A622*.

20

**[0186]** El ADNc de A622 de tabaco con un sitio *NcoI* introducido en el primer ATG se escindió del vector pcDNAII-A622 (Hibi y col., 1994) como fragmento *NcoI-BamHI* y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador duplicado. Esta casete para la sobreexpresión de A622 se escindió con *HindIII* y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de A622 pGA-A622.

25

*Producción de plantas transgénicas*

30

**[0187]** El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. belladonna* con *A. tumefaciens* con el procedimiento de los discos de hoja, básicamente según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección para la transformación por pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (200 mg/l en medio MS/B5). A partir de los discos de hoja se regeneraron plantas transgénicas para 35S-A622, que se cultivaron a 22 °C en una cámara climática en condiciones de luz continua.

35

*Procedimiento para el análisis de la expresión*

40

**[0188]** Las proteínas totales se extrajeron de las hojas de plantas naturales y plantas 35S-A622 T1, según se describe anteriormente en el ejemplo 5. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con suero de ratón dirigido contra A622. Para el análisis de alcaloides se usaron los tejidos de hojas de plantas de la generación T1 autopolinizadas que contenían grandes cantidades de la proteína A622, como la línea C1 n°3 (véase la figura 7).

45

*Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

**[0189]** Los alcaloides nicotínicos en plantas transgénicas de *A. belladonna* se extrajeron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se purificaron básicamente según se ha descrito (Hashimoto y col., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min. La introducción de solo A622 en *A. belladonna* no resultó en la acumulación de nicotina ni de otros alcaloides nicotínicos.

50

55

**EJEMPLO 8: raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan las proteínas NBB1 y A622**

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1*

**[0190]** Para investigar si la combinación de NBB1 y A622 es suficiente para la reacción de acoplamiento de alcaloides nicotínicos, se produjeron raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresaban a la vez A622 y NBB1 mediante la transformación de hojas de las plantas de *Atropa* que expresaban A622 del ejemplo 7 con una cepa 15834 de *A. rhizogenes* que contenía un vector de expresión de NBB1.

#### Descripción de pBI101H-E2113-DEST

**[0191]** El vector binario pBE2113 que contiene el promotor CaMV35S con un potenciador duplicado (EI2) y la secuencia de la región 5' del virus del mosaico del tabaco ( $\Omega$ ) se obtuvo de Dr. Yuko Ohashi, Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos (Tsukuba, Japón), véase Plant Cell Physiol. 37: 49-59 (1996), y se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector, lo que sustituyó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. El vector binario de destino resultante se digirió con *HindIII* y *SacI* y el fragmento *HindIII-SacI* que contenía la casete EI2-35S-S2-GATEWAY se clonó entre los sitios *HindIII* y *SacI* de pBI101H. El vector binario de destino resultante se denominó pBI101H-E2113-DEST. En la figura 4E se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST.

**[0192]** La ORF de NBB1 se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pBI101H-E2113-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión se denominó pEI235S $\Omega$ -NBB1. En la figura 4F se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pEI235S $\Omega$ -NBB1.

#### Producción de raíces capilares transgénicas

**[0193]** El vector binario pEI235S $\Omega$ -NBB1 se introdujo en la cepa 15834 de *A. rhizogenes* por electroporación. A continuación, se transformaron tejidos de hoja de plantas de la generación T1 que contenían una casete 35S-A622 de expresión de A622 (línea C1 n° 3) con el *A. rhizogenes* que contenía pEI235S $\Omega$ -NBB1 mediante el procedimiento de los discos de hoja, según describen Kanegae y col. (Plant Physiol. 105(2): 483-90 (1994)). Como marcador de selección se usó la resistencia a higromicina (30 mg/l en medio B5). Las raíces capilares transgénicas que contenían el ADN-T de pEI235S $\Omega$ -NBB1 (línea E) y raíces capilares transgénicas infectadas con *A. rhizogenes* natural, sin ADN-T, como control (línea WT) se cultivaron en el medio líquido MS/B5 durante dos semanas y entonces se recolectaron.

#### Análisis de la expresión

**[0194]** Las proteínas totales se extrajeron y se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Para la detección de la proteína A622 se usó suero de ratón dirigido contra A622, mientras que para la detección de la proteína NBB1 se usó suero de conejo dirigido contra NBB1. Una línea transgénica de raíces capilares de *A. belladonna* (E2) expresa grandes cantidades de las dos proteínas NBB1 y A622 (véase la figura 8).

#### Análisis de alcaloides

**[0195]** Las raíces capilares de *A. belladonna* transgénica E2 y WT se cultivaron durante tres semanas en 10 ml del medio líquido MS/B5 con 100 mg/ml de ácido nicotínico. Los alcaloides nicotínicos en las raíces capilares de E2 y WT se extrajeron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se purificaron, básicamente según se ha descrito (Hashimoto et al., 1992). Los alcaloides se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) (Hewlett Packard 5890 serie II/JEOL MStation JMS700 con una columna HP-5ms) después de la comparación de su espectro de masas con los de estándares de autenticidad. La temperatura de la columna se mantuvo a 100 °C durante 10 min, se elevó a 150 °C a 25 °C/min, se mantuvo a 150 °C durante 1 min, se elevó a 170 °C a 1 °C/min, se mantuvo a 170 °C durante 2 min, se elevó a 300 °C a 30 °C/min y entonces se mantuvo a 300 °C durante 10 min.

**[0196]** Se detectó un nuevo pico pequeño pero distinto (véase el pico 5 en la figura 9). En las raíces capilares de la línea WT no se detectó ningún pico correspondiente al pico 5. El compuesto del pico 5 mostró un perfil de fragmentación en EM idéntico al de la nicotina, según se muestra en la figura 10. Esto demuestra que la expresión de NBB1 y A622 exógenas es suficiente para la formación de nicotina en raíces capilares de *A. belladonna*.

#### EJEMPLO 9: aumento del contenido de nicotina por la expresión de PMT bajo el control del promotor de A622

*Descripción de pA622pro-DEST*

**[0197]** pA622pro-DEST tiene la casete de expresión del gen *NPTII* y la casete de expresión del gen *HPT* como marcadores de selección. El promotor de *A622* de 1.407 pb se amplificó mediante un vector que contenía el promotor de *A622* (Shoji y col., *Plant Mol. Biol.* 50: 427-440 (2002)) como molde y los cebadores específicos del promotor de *A622* que se muestran a continuación y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBII0IH. El vector binario se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY, después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector binario. Véase la figura 11A.

Cebadores específicos del promotor de *A622*

15 A622pro-OIF 5' AAAAGCTTAGATCTCTCTTATGTTTCATG  
se subraya el sitio *HindIII*  
A622pro-02R 5' TCTAGATTTACTCCTAGGGGAAGAAAAAAGTAGC  
se subraya el sitio *XbaI*

20 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT*

**[0198]** Se amplificó un fragmento *attB*-PMT usando un vector con *PMT* de tabaco, en el que la ORF de *PMT* (número de acceso de NCBI D28506) se había clonado en el sitio *BstXI* de pcDNAII (Invitrogen) (véase SEQ ID NO: 7B), como molde, los cebadores específicos del gen mostrados a continuación y cebadores adaptadores de la secuencia *attB*, según se describe anteriormente en el ejemplo 4. El clon de entrada para el sistema GATEWAY, pDONR221-PMT, se creó mediante una reacción de recombinación BP entre el producto de PCR, *attB*-PMT, y pDONR221 (Invitrogen).

Cebadores específicos del gen

30 PMT-attB1 5' AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGAAGTCATATC  
PMT-attB2 5' AGAAAGCTGGGTTTAAGACTCGATCATACTTC

35 **[0199]** La ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-PMTox. Véase la figura 11B.

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

40 **[0200]** El vector pA622pro-PMTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas del la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

45 *Análisis de alcaloides*

**[0201]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con pA622pro-PMTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete AG-GUS. Véase la figura 12.

**EJEMPLO 10: aumento del contenido de nicotina por la expresión de *PMT* bajo el control del promotor TobRD2**

55 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de PMT*

**[0202]** La ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó

pTobRD2-PMTox. Véase la figura 11C.

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

- 5 **[0203]** El vector pTobRD2-PMTox se transformó en la cepa ERA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

*Análisis de alcaloides*

10

**[0204]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS.

15 Véase la figura 13.

**EJEMPLO 11: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor de A622**

20 *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT*

**[0205]** El fragmento de la ORF de QPT (SEQ ID NO: 5B) se amplificó usando el vector pBJY6 (proporcionado por Dr. Kenzo Nakamura, Universidad de Nagoya, Japón) como molde y los cebadores específicos del gen mostrados a continuación. Se creó un clon de entrada de GATEWAY, pENTR-QPT, mediante una reacción de clonación TOPO.

25

*Cebadores específicos del gen QPT*

QPT-F 5' CACCATGTTTAGAGCTATTCC

30 QPT-R 5' TCATGCTCGTTTTGTACGCC

**[0206]** La ORF de QPT se transfirió desde el vector pENTR-QPT al vector binario de GATEWAY pA622pro-DEST (véase la figura 11A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pA622pro-QPTox. Véase la figura 11D.

35

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

**[0207]** El vector pA622-QPTox se transformó en la cepa ERA10S de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

40

*Análisis de alcaloides*

**[0208]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete A622-GUS. Véase la figura 14.

45

50 **EJEMPLO 12: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de QPT bajo el control del promotor TobRD2**

*Preparación de la construcción para la sobreexpresión de QPT*

55 **[0209]** La ORF de QPT se transfirió desde el vector pDONR221-QPT al vector binario de GATEWAY pTobRD2-DEST (véase la figura 4A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pTobRD2pro-QPTox. Véase la figura 11E.

*Producción de plantas transgénicas de tabaco*

**[0210]** El vector pTobRD2-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

5

#### *Análisis de alcaloides*

**[0211]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete TobRD2-GUS. Véase la figura 15.

### **EJEMPLO 13: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de *PMT* y *QPT* bajo el control del promotor de *A622***

15

#### *Descripción de pBI221-A622pro-DEST*

**[0212]** pBI221-A622pro-DEST fue el vector básico para la construcción del vector binario de expresión multigénica. El promotor de *A622* de 1.407 pb se amplificó con el uso del vector pUC19-A622profull-LUC como molde y los cebadores específicos del promotor de *A622* y se digirió con *HindIII* y *XbaI*. El fragmento resultante se clonó entre los sitios *HindIII* y *XbaI* en pBI221 (Clontech), con lo que se substituyó el promotor CaMV35S por el promotor de *A622*. El vector se convirtió en un vector de destino para el sistema GATEWAY después de clonar la casete de GATEWAY, que contiene los sitios de recombinación *attR* flanqueando un gen *ccdB* y un gen de resistencia a cloranfenicol, entre los sitios *XbaI* y *SacI* en el vector, lo que substituyó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa por dicha casete de GATEWAY. Después se insertó un adaptador *HindIII-EcoRI* en el sitio *EcoRI* en el extremo 3' del terminador Nos, lo que dio lugar a pBI221-A622pro-DEST.

20

25

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT-QPT**

30

**[0213]** Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas *PMT* y *QPT*, las cassetes de expresión *A622pro-PMT* y *A622pro-QPT* se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de *PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-A622pro-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-A622pro-PMT. pBI221-A622pro-PMT se digirió con *HindIII* y después se clonó en el sitio *HindIII* en el extremo 5' del promotor de *A622* del vector pA622pro-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pA622pro-PMTox-QPTox. En la figura 11F se muestra un diagrama de la región de ADN-T de pA622pro-PMTox-QPTox.

35

#### *Producción de plantas transgénicas de tabaco*

40

**[0214]** El vector pA622pro-PMTox-QPTox se transformó en la cepa ERA10S de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos T0 y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

45

**[0215]** Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transformadas con pA622pro-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, en las que plantas K326 naturales habían sido transformadas con una casete *A622-GUS*. Véase la figura 16.

50

### **EJEMPLO 14: aumento del contenido de nicotina mediante la expresión de *PMT* y *QPT* bajo el control del promotor *TobRD2***

55

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de *PMT-QPT**

**[0216]** Con el fin de expresar en exceso las dos proteínas *PMT* y *QPT* bajo el control de *TobRD2*, las cassetes de expresión *TobRD2-PMT* y *TobRD2-QPT* se clonaron en tándem en un vector binario. Primeramente, la ORF de

*PTM* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT al vector binario de GATEWAY pBI221-TobRD2-DEST mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denominó pBI221-TobRD2-PMT. El vector pBI221-TobRD2-PMT se digirió con *Hind*III y después se clonó en el sitio *Hind*III en el extremo 5' del promotor TobRD2 en pTobRD2-QPTox. El vector de expresión de *PTM-QPT* resultante se denominó pTobRD2-PMTox-QPTox. Véase la figura 11G.

5

#### *Producción de plantas transgénicas de tabaco*

[0217] El vector pTobRD2-PMTox-QPTox se transformó en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se usó para transformar hojas de la variedad K326 natural. Se regeneraron brotes transgénicos TO y se transfirieron al medio de enraizamiento. Varias plantas transgénicas enraizadas se transfirieron al suelo.

10

#### *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

[0218] Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Se analizó el contenido de nicotina en las hojas de plantas muestreadas 36 días después de su transferencia al suelo. Varias líneas transgénicas transformadas con TobRD2-PMTox-QPTox mostraron mayor acumulación de nicotina que las líneas de control, plantas K326 naturales transformadas con un casete TobRD2-GUS. Véase la figura 17.

15

### 20 **EJEMPLO 15: producción de alcaloides nicotínicos en *Arabidopsis* mediante la expresión de *NBB1* en combinación con enzimas de la biosíntesis de alcaloides adicionales**

[0219] Las plantas de *Arabidopsis* no producen alcaloides nicotínicos. Sin embargo, un precursor de numerosos alcaloides nicotínicos, el ácido nicotínico, es un metabolito común. Se estudió el efecto de la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* en *Arabidopsis*. Dado que la nicotina es un alcaloide de especial interés, se incluyó la expresión de *PMT* para aumentar la disponibilidad de metilputrescina, un precursor del anillo de pirrolidina en la nicotina.

25

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de A622*

30

[0220] El ADNc de *A622* de tabaco que contenía un sitio *Nco*I introducido en el primer ATG (Hibi y col., 1994) se escindió de pCDNAII (Invitrogen) como fragmento *Nco*I-*Bam*HI y se clonó en pRTL2 (Restrepo y col., Plant Cell 2: 987-98 (1990)) bajo el control del promotor CaMV35S con un potenciador doble. Esta casete para la sobreexpresión de *A622* se escindió con *Hind*III y se clonó en el vector binario pGA482 (Amersham) para producir el vector de expresión de *A622* pGA-A622.

35

#### *Producción de plantas transgénicas para 35S-A622*

[0221] El vector binario pGA-A622 se introdujo por electroporación en la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se transformaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Wassilewskija (WS)) con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inducción de callo y regeneración de plantas descrito básicamente por Akama y col., Plant Cell Reports 12: 7-11 (1992). Como marcador de selección para la transformación con pGA-A622 se usó la resistencia a kanamicina (50 mg/l en medio de inducción de brotes). A partir del callo se regeneraron plantas transgénicas, que se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática.

45

#### *Preparación de la construcción para la sobreexpresión de NBB1 y PMT*

[0222] La ORF de *NBB1* (SEQ ID NO: 1B) se transfirió desde el vector pDONR221-NBB1-2 al vector binario de GATEWAY pGWB2 (véase la figura 18A) mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen, en el que *NBB1* está unido al promotor CaMV35S, se denominó p35S-NBB1. Véase la figura 18B. De manera similar, la ORF de *PMT* se transfirió desde el vector pDONR221-PMT a pGWB2, mediante una reacción LR. El vector de expresión del gen se denomina p35S-PMT. Véase la figura 18C.

50

#### *Producción de plantas transgénicas para 35S-A622-35S-NBB1, para 35S-A622-35S-PMT y para 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT*

55

[0223] Los vectores binarios p35S-NBB1 y p35S-PMT se introdujeron por electroporación en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Las plantas de la generación T1 que contenían pGA-A622 se transformaron con *A. tumefaciens* mediante un procedimiento de inmersión floral, básicamente según describen Clough y col., Plant J. 16: 735-43

(1998). Como marcador de selección para la transformación con p35S-NBB1 y p35S-PMT se usó la resistencia a higromicina (25 mg/l en medio de inducción de brotes). Las plantas transgénicas se cultivaron a 23 °C en condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad en una cámara climática. Las plantas transgénicas resultantes se identificaron por PCR genómica con los cebadores del promotor 35S y cebadores específicos de los genes *NBB1* y *PMT*.

Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-NBB1

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG  
10 NBB1-1140 5' TGAGCCCAAGCTGTTTCAGAATCC

Cebadores para la identificación de las plantas con 35S-A622-35S-PMT

35S-F 5' ACCCTTCCTCTATATAAGGAAG  
15 PMT-01R 5' CGCTAAACTCTGAAAACCAGC

[0224] Las plantas positivas para 35S-A622-35S-NBB1 y las plantas positivas para 35S-A622-35S-PMT se cruzaron para producir plantas con 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT. La descendencia F1 se analizó por PCR genómica con el par de cebadores específico de cada casete de expresión.

20 [0225] De las líneas positivas por PCR se extrajeron las proteínas totales. La raíces congeladas se homogeneizaron inmediatamente en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %) que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y ditiotreitolo 200 mM mediante un mortero y mano. Después de la centrifugación de los homogeneizados, las proteínas solubles en el sobrenadante se separaron por SDS-PAGE. El análisis de inmunotransferencia se llevó a cabo con suero de ratón dirigido contra A622 para la detección de la proteína A622 y suero de conejo dirigido contra NBB1 para la detección de la proteína NBB1, según se describe en Shoji y col., Plant Mol. Biol. 50: 427-40 (2002). Se obtuvieron líneas transgénicas de expresión que contenían los dos polipéptidos A622 y NBB1. Véase la figura 19.

30 *Procedimiento para el análisis de los niveles de alcaloides*

[0226] Se seleccionaron líneas transgénicas que expresaban *NBB1* y *A622* y se usaron para el análisis de alcaloides. Los alcaloides se extrajeron de las hojas del tabaco transgénico y se analizaron según se describe anteriormente en el ejemplo 4. Como se muestra en la figura 20, se encontró un nuevo pico correspondiente al tiempo de elución de la nicotina en la línea *NBB1-A622-PMT*, pero no en la línea *A622-PTM*. Esto demuestra que la expresión conjunta de *NBB1* y *A622* es más eficaz que la expresión de solo *A622* para la producción de alcaloides nicotínicos en una planta que normalmente no produce alcaloides.

#### EJEMPLO 16: expresión de *NBB1* y *A622* en células no vegetales

40 [0227] El sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) de células de insectos y baculovirus se usó para expresar las proteínas *NBB1* y *A622* con una etiqueta 6x-His en células de insectos. Con el fin de construir el clon de expresión, las ORF de *NBB1* y *A622* (SEQ ID NO: 1B y 3B, respectivamente) se transfirieron desde los vectores DONR respectivos (pDONR-NBB1-2, pDONR-A622) al vector de GATEWAY pDEST10 (Invitrogen) mediante reacciones LR. Los clones de expresión resultantes se denominaron pDEST10-NBB1 y pDEST10-A622.

[0228] pDEST10-NBB1 y pDEST10-A622 se transformaron en células MAX Efficiency DH10Bac (Invitrogen) para recuperar el ADN de los b́acmidos recombinantes. Para verificar la presencia de los b́acmidos recombinantes con *A622* y *NBB1* se usó un análisis de PCR con un cebador específico de los genes y un cebador inverso de M13. Véase la figura 21A.

[0229] Los b́acmidos recombinantes resultantes que contenían los casetes de expresión de los genes respectivos se transfectaron en las células de insectos Sf9 con Cellfectin (Invitrogen). Las células Sf9 se infectaron con los cultivos de virus en dos tandas para amplificar y aumentar la producción de los virus.

55 [0230] *NBB1* y *A622* se produjeron en los cultivos de las células de insectos, según muestra la inmunotransferencia con los antisueros dirigidos contra *NBB1* y *A622*. Las proteínas recombinantes que contenían la etiqueta de 6x-His se purificaron por adsorción en columnas de Ni-NTA, seguida de elución con imidazol 0,5 M. Véase la figura 21B.

**Cláusulas:**

**[0231]**

- 5 Cláusula 1. Un procedimiento para aumentar la nicotina en una planta de *Nicotiana* que comprende sobreexpresar al menos uno de *A622* y *NBB1* con respecto a una planta de control.
- Cláusula 2. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *A622*.
- 10 Cláusula 3. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresa *NBB1*.
- Cláusula 4. El procedimiento según la cláusula 1, en el que se sobreexpresan *A622* y *NBB1*.
- Cláusula 5. El procedimiento según la cláusula 4, que comprende además sobreexpresar al menos uno de *QPT* y  
15 *PMT*.
- Cláusula 6. El procedimiento según la cláusula 5, en el que se sobreexpresan *QPT* y *A622*.
- Cláusula 7. Planta con mayor nicotina producida mediante cualquiera de los procedimientos según las cláusulas 1-5.  
20 Cláusula 8. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 7.
- Cláusula 9. Producto según la cláusula 8, en el que dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.  
25 Cláusula 10. Procedimiento para producir alcaloides nicotínicos, que comprende expresar *NBB1* y *A622* de manera heteróloga en una planta o célula que de otro modo no producen alcaloides nicotínicos.
- Cláusula 11. Procedimiento según la cláusula 10, en el que la expresión de *NBB1* y *A622* tiene lugar en una célula  
30 seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, de levadura, hongo filamentosos, alga, mamífero e insecto.
- Cláusula 12. Planta con mayor cantidad de alcaloides nicotínicos producida mediante el procedimiento según la  
cláusula 10.  
35 Cláusula 13. Producto alcaloide nicotínico producido mediante el procedimiento según la cláusula 10.
- Cláusula 14. Procedimiento para producir un alcaloide nicotínico, que comprende (a) disponer de una pluralidad de  
células que expresan *A622* y *NBB1* y (b) obtener dicho alcaloide nicotínico de dicha pluralidad.  
40 Cláusula 15. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta, que comprende sobreexpresar *PMT* y *QPT* en relación con una planta de control.
- Cláusula 16. Planta con mayor nicotina producida mediante el procedimiento de la cláusula 15.  
45 Cláusula 17. Producto con mayor nicotina producido a partir de la planta según la cláusula 15.
- Cláusula 18. Procedimiento de producción de la enzima *NBB1*, que comprende transformar una célula con una  
molécula de ácido nucleico aislada que codifica *NBB1* y crecer la célula transformada en condiciones de manera que  
50 se produce la enzima *NBB1*.
- Cláusula 19. Procedimiento según la cláusula 18, en el que la célula transformada se selecciona del grupo que  
consiste en células de bacterias, levadura, hongo filamentosos, alga, plantas verdes y mamíferos.
- 55 Cláusula 20. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que  
comprende:  
(a) cruzar una planta de *Nicotiana* con mayor nicotina con una planta de *Nicotiana* con mayor rendimiento; y  
(b) seleccionar la planta progenie con una mayor nicotina y un mayor rendimiento.

Cláusula 21. Procedimiento según la cláusula 20, en el que dicha planta con mayor nicotina se produce mediante:

- (a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina;
- (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
- 5 (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una planta de control.

Cláusula 22. Procedimiento según la cláusula 21, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

10

Cláusula 23. Planta con mayor nicotina y rendimiento producida mediante el procedimiento según la cláusula 20.

Cláusula 24. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, que comprende:

- 15 (a) transformar una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa el rendimiento;
- (b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y
- 20 (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina y un mayor rendimiento en relación con una planta de control.

Cláusula 25. Procedimiento según la cláusula 24, en el que dicha primera construcción comprende una ácido nucleico que codifica una enzima selecciona del grupo que consiste en *QPT*, *PMT*, *A622* y *NBB1*.

25

Cláusula 26. Procedimiento para incrementar la nicotina en *N. tabacum*, que comprende sobreexpresar *PMT* en relación con una planta de control.

LISTADO DE SECUENCIAS

30

[0232]

<110> 22<sup>nd</sup> Century Limited, LLC  
 <120> Aumento de los niveles de alcaloides nicotínicos  
 35 <130> P33628EP-D1-PCT  
 <140> No asignado  
 <141> 2006-09-13  
 <150> EP06848676.0  
 <151> 2006-09-13  
 40 <160> 33  
 <170> PatentIn version 3.5  
 45 <210> 1  
 <211> 1749  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana* sp.

50

|         |            |            |            |            |            |             |     |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| <400> 1 | acgcggggag | aaatacatac | aacatgtttc | cgctcataat | tctgatcagc | ttttcacttg  | 60  |
|         | cttccttgtc | tgaaactgct | actggagctg | ttacaaatct | ttcagcctgc | ttaatcaacc  | 120 |
|         | acaatgtcca | taacttctct | atttacccca | caagtagaaa | ttactttaac | ttgctccact  | 180 |
|         | tctcccttca | aaatcttcgc | tttgctgcac | ctttcatgcc | gaaaccaacc | ttcattatcc  | 240 |
| 55      | taccaagcag | taaggaggag | ctcgtgagca | ccattttttg | ttgcagaaaa | gcattcttatg | 300 |
|         | aaatcagagt | aaggtgcggc | ggacacagtt | acgaaggaac | ttcttacggt | tcctttgacg  | 360 |
|         | cttctccatt | cgtgatcggt | gacttgatga | aattagacga | cgtttcagta | gatttggatt  | 420 |
|         | ctgaaacagc | ttgggctcag | ggcggcgcaa | caattggcca | aatttattat | gccattgcca  | 480 |
|         | aggtaagtga | cgttcatgca | ttttcagcag | gttcgggacc | aacagtagga | tctggaggtc  | 540 |
| 60      | atatttcagg | tggtggattt | ggacttttat | ctagaaaatt | cggacttgct | gctgataatg  | 600 |

ES 2 543 907 T3

```

tcgttgatgc tcttcttatt gatgctgatg gacgggttatt agaccgaaaa gccatgggcg 660
aagacgtggt ttgggcaatc agaggtggcg gcgggtggaaa ttggggcatt gtttatgcct 720
ggaaaattcg attactcaaa gtgcctaaaa tcgtaacaac ttgtatgac tataggcctg 780
gatccaaaca atacgtggct caaatacttg agaaatggca aatagttact ccaaatttgg 840
5 tcgatgattt tactctagga gtactgctga gacctgcaga tctacccgcg gatatgaaat 900
atggtaatac tactcctatt gaaatatttc cccaattcaa tgcactttat ttgggtccaa 960
aaactgaagt tctttccata tcgaatgaga catttccgga gctaggcggt aagaatgatg 1020
agtgcaagga aatgacttgg gtagagtcag cacttttctt ctccgaatta gctgacgta 1080
acgggaactc gactgggtgat atctcccgtc tgaaagaacg ttacatggac ggaaaaggtt 1140
10 ttttcaaagg caaaacggac tacgtgaaga agccagtttc aatggatggg atgctaacat 1200
ttcttgggaa actcgagaaa aaccggaagg gatattcttg ctttgatcct tatggcggag 1260
ccatggacaa gattagtgat caagctattg ctttccctca tagaaaaggt aaccttttcg 1320
cgattcagta tctagcacag tggaatgaag aggacgatta catgagcgac gtttacatgg 1380
agtggataag aggattttac aatacaatga cgccctttgt ttcaagctcg ccaaggggag 1440
15 cttatatcaa ctacttggat atggatcttg gagtgaatat ggtcgacgac tacttattgc 1500
gaaatgctag tagcagttag ctttcttctt ctgttgatgc tgtggagaga gctagagcgt 1560
ggggtgagat gtatttcttg cataactatg ataggttggg taaagctaag acacaaattg 1620
atccactaaa tgtttttcga catgaacaga gtattcctcc tatgcttggg tcaacgcaag 1680
agcacaagta tagcagtgaa tgagatttaa aatgtactac cttgagagag attccgttgt 1740
20 tagttttcc 1749

```

<210> 2  
 <211> 559  
 <212> PRT

25 <213> Nicotiana sp.

<400> 2

```

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

```

ES 2 543 907 T3

260  
 Val Asp Asp Phe Thr Leu Gly Val 265  
 275 Leu Leu Arg Pro Ala Asp Leu Pro  
 280  
 5 Ala Asp Met Lys Tyr Gly Asn Thr Thr Pro Ile Glu Ile Phe Pro Gln  
 290 295 300  
 Phe Asn Ala Leu Tyr Leu Gly Pro Lys Thr Glu Val Leu Ser Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Thr Phe Pro Glu Leu Gly Val Lys Asn Asp Glu Cys Lys Glu  
 325 330 335  
 10 Met Thr Trp Val Glu Ser Ala Leu Phe Phe Ser Glu Leu Ala Asp Val  
 340 345 350  
 Asn Gly Asn Ser Thr Gly Asp Ile Ser Arg Leu Lys Glu Arg Tyr Met  
 355 360 365  
 15 Asp Gly Lys Gly Phe Phe Lys Gly Lys Thr Asp Tyr Val Lys Lys Pr  
 370 375 380  
 Val Ser Met Asp Gly Met Leu Thr Phe Leu Val Glu Leu Glu Lys Asn  
 385 390 395 400  
 Pro Lys Gly Tyr Leu Val Phe Asp Pro Tyr Gly Gly Ala Met Asp Lys  
 405 410 415  
 20 Ile Ser Asp Gln Ala Ile Ala Phe Pro His Arg Lys Gly Asn Leu Phe  
 420 425 430  
 Ala Ile Gln Tyr Leu Ala Gln Trp Asn Glu Glu Asp Asp Tyr Met Ser  
 435 440 445  
 25 Asp Val Tyr Met Glu Trp Ile Arg Gly Phe Tyr Asn Thr Met Thr Pro  
 450 455 460  
 Phe Val Ser Ser Ser Pro Arg Gly Ala Tyr Ile Asn Tyr Leu Asp Met  
 465 470 475 480  
 Asp Leu Gly Val Asn Met Val Asp Asp Tyr Leu Leu Arg Asn Ala Ser  
 485 490 495  
 30 Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Val Asp Ala Val Glu Arg Ala Arg Ala  
 500 505 510  
 Trp Gly Glu Met Tyr Phe Leu His Asn Tyr Asp Arg Leu Val Lys Ala  
 515 520 525  
 35 Lys Thr Gln Ile Asp Pro Leu Asn Val Phe Arg His Glu Gln Ser Ile  
 530 535 540  
 Pro Pro Met Leu Gly Ser Thr Gln Glu His Lys Tyr Ser Ser Glu  
 545 550 555

<210> 3  
 40 <211> 1179  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 3

45 aaaaatccga ttaattcct agtttctagc ccctccacct taaccggaag ctactttttt 60  
 tcttccccta ggagtaaaat ggttgatca gagaaaagca agatcttaat aattggaggc 120  
 acaggctaca taggaaaata cttggtggag acaagtgcaa aatctgggca tccaactttc 180  
 gctcttatca gagaaagcac actcaaaaac cccgagaaat caaaactcat cgacacattc 240  
 aagagttatg gggttacgct acttttttga gatatatcca atcaagagag cttactcaag 300  
 50 gcaatcaagc aagttgatgt ggtgatttcc actgtcggag gacagcaatt tactgatcaa 360  
 gtgaacatca tcaagcaat taaagaagct ggaaatatca agagatttct tccttcagaa 420  
 tttggatttg atgtggatca tgctcgtgca attgaaccag ctgcatcact cttcgtccta 480  
 aaggtaaaga tcaggaggat gatagaggca gaaggaattc catacacata tgtaatctgc 540  
 aattggtttg cagatttctt cttgcccac ttggggcagt tagaggccaa aaccctcct 600  
 55 agagacaaag ttgtcatttt tggcgtatga aatcccaaag caatatatgt gaaggaagaa 660  
 gacatagcga catacactat cgaagcagta gatgatccac ggacattgaa taagactctt 720  
 cacatgagac cacctgcaa tattctatcc ttcaacgaga tagtgtcctt gtggaggac 780  
 aaaattggga agaccctcga gaagttatat ctatcagagg aagatattct ccagattgta 840  
 caagagggac ctctgccatt aaggactaat ttggccatat gccattcagt ttttgtaat 900  
 60 ggagattctg caaactttga ggttcagcct cctacagggt tcgaagccac tgagctatat 960  
 ccaaaagtga aatacacaac cgtcgacgag ttctacaaca aatttgtcta gtttgtcgat 1020

ES 2 543 907 T3

atcaatctgc ggtgactcta tcaaacttgt tgtttctatg aatctattga gtgtaattgc 1080  
aataatcttc gcttcagtg c ttttgcaact gaaatgtact agctagtga acgctagcta 1140  
aattctttac tgtttgttttc tatttttctg cttattcca 1179

5 <210> 4  
<211> 310  
<212> PRT  
<213> Nicotiana sp.

10 <400> 4

Met Val Val Ser Glu Lys Ser Lys Ile Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15  
Tyr Ile Gly Lys Tyr Leu Val Glu Thr Ser Ala Lys Ser Gly His Pro  
15 20 25 30  
Thr Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Thr Leu Lys Asn Pro Glu Lys Ser  
35 40 45  
Lys Leu Ile Asp Thr Phe Lys Ser Tyr Gly Val Thr Leu Leu Phe Gly  
50 55 60  
20 Asp Ile Ser Asn Gln Glu Ser Leu Leu Lys Ala Ile Lys Gln Val Asp  
65 70 75 80  
Val Val Ile Ser Thr Val Gly Gly Gln Gln Phe Thr Asp Gln Val Asn  
85 90 95  
Ile Ile Lys Ala Ile Lys Glu Ala Gly Asn Ile Lys Arg Phe Leu Pro  
100 105 110  
25 Ser Glu Phe Gly Phe Asp Val Asp His Ala Arg Ala Ile Glu Pro Ala  
115 120 125  
Ala Ser Leu Phe Ala Leu Lys Val Arg Ile Arg Arg Met Ile Glu Ala  
130 135 140  
30 Glu Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ile Cys Asn Trp Phe Ala Asp Phe  
145 150 155 160  
Phe Leu Pro Asn Leu Gly Gln Leu Glu Ala Lys Thr Pro Pro Arg Asp  
165 170 175  
Lys Val Val Ile Phe Gly Asp Gly Asn Pro Lys Ala Ile Tyr Val Lys  
180 185 190  
35 Glu Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Thr Ile Glu Ala Val Asp Pro Arg  
195 200 205  
Thr Leu Asn Lys Thr Leu His Met Arg Pro Pro Ala Asn Ile Leu Ser  
210 215 220  
40 Phe Asn Glu Ile Val Ser Leu Trp Glu Asp Lys Ile Gly Lys Thr Leu  
225 230 235 240  
Glu Lys Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Ile Leu Gln Ile Val Gln Glu  
245 250 255  
Gly Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asn Leu Ala Ile Cys His Ser Val Phe  
260 265 270  
45 Val Asn Gly Asp Ser Ala Asn Phe Glu Val Gln Pro Pro Thr Gly Val  
275 280 285  
Glu Ala Thr Glu Leu Tyr Pro Lys Val Lys Tyr Thr Thr Val Asp Glu  
290 295 300  
50 Phe Tyr Asn Lys Phe Val  
305 310

<210> 5  
<211> 1399  
55 <212> ADN  
<213> Nicotiana sp.

<400> 5

caaaaactat tttccacaaa attcatttca caaccccccc aaaaaaaaaac catgtttaga 60  
60 gctatttcctt tcaactgctac agtgcacatcct tatgcaatta cagctccaag gttggtggtg 120

ES 2 543 907 T3

```

aaaatgtcag caatagccac caagaataca agagtggagt cattagaggt gaaaccacca 180
gcacacccaa cttatgattt aaaggaagtt atgaaacttg cactctctga agatgctggg 240
aatttaggag atgtgacttg taaggcgaca attcctcttg atatggaatc cgatgctcat 300
tttctagcaa aggaagacgg gatcatagca ggaattgcac ttgctgagat gatattcgcg 360
5 gaagttgatc cttcattaaa ggtggagtg tatgtaaatg atggcgataa agttcataaa 420
ggcttgaaat ttggcaaagt acaaggaaac gcttacaaca ttgttatagc tgagagggtt 480
gttctcaatt ttatgcaaag aatgagtgga atagctacac taactaagga aatggcagat 540
gctgcacacc ctgcttacat cttggagact aggaaaactg ctcttgatt acgtttggtg 600
gataaatggg cgggtattgat cgggtggggg aagaatcaca gaatgggctt atttgatatg 660
10 gtaatgataa aagacaatca catactgct gctggagggtg tcggcaaagc tctaaaatct 720
gtggatcagt atttggagca aaataaactt caaatagggg ttgaggttga aaccaggaca 780
attgaagaag tacgtgaggt tctagactat gcatctcaaa caaagacttc gttgactagg 840
ataatgctgg acaatatggt tgttccatta tctaacggag atattgatgt atccatgctt 900
aaggaggctg tagaattgat caatgggagg tttgatacgg aggcttcagg aaatggtacc 960
15 cttgaaacag tacacaagat tggacaaact ggtgttacct acatttctag tggtgccctg 1020
acgcattccg tgaagactc tgacatttcc ctgaagatcg atacagagct cgccttgaa 1080
gttggaagcg gtacaaaacg agcatgagcg ccattacttc tgctataggg ttggagtaaa 1140
agcagctgaa tagctgaaag gtgcaaataa gaatcatttt actagtgtgc aaacaaaaga 1200
tccttcactg tgtaatcaaa caaaaagatg taaattgctg gaatatctca gatggctctt 1260
20 ttccaacctt attgcttgag ttggtaattt cattatagct ttgttttcat gtttcatgga 1320
atgttttata agtttggtgt atgtaaaatt ctgtgttact 1380
tcaaatattt tgagatggtt 1399

```

```

<210> 6
25 <211> 351
<212> PRT
<213> Nicotiana sp.

```

<400> 6

```

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

```

ES 2 543 907 T3

Thr Arg Thr Ile Glu Glu Val Arg Glu Val Leu Asp Tyr Ala Ser Gln  
 245 250 255  
 Thr Lys Thr Ser Leu Thr Arg Ile Met Leu Asp Asn Met Val Val Pro  
 260 265 270  
 5 Leu Ser Asn Gly Asp Ile Asp Val Ser Met Leu Lys Glu Ala Val Glu  
 275 280 285  
 Leu Ile Asn Gly Arg Phe Asp Thr Glu Ala Ser Gly Asn Val Thr Leu  
 290 295 300  
 10 Glu Thr Val His Lys Ile Gly Gln Thr Gly Val Thr Tyr Ile Ser Ser  
 305 310 315  
 Gly Ala Leu Thr His Ser Val Lys Ala Leu Asp Ile Ser Leu Lys Ile  
 325 330 335  
 Asp Thr Glu Leu Ala Leu Glu Val Gly Arg Arg Thr Lys Arg Ala  
 340 345 350

15  
 <210> 7  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

20  
 <400> 7  
 ggaaaataca aaccataata ctttctcttc ttcaatttgt ttagtttaat tttgaaaatg 60  
 gaagtcatat ctaccaacac aaatggctct accatcttca agaatgggtgc cattccccatg 120  
 aacggccacc aaaatggcac ttctgaacac ctcaacggct accagaatgg cacttccaaa 180  
 25 caccaaaacg ggcaccagaa tggcactttc gaacatcgga acggccacca gaatgggaca 240  
 tccgaacaac agaacgggac aatcagccat gacaatggca acgagctact gggaaagctcc 300  
 gactctatta agcctggctg gttttcagag tttagcgcac tatggccagg tgaagcattc 360  
 tcacttaagg ttgagaagtt actattccag gggaaagtctg attaccaaga tgtcatgctc 420  
 tttgagtcag caacttatgg gaaggttctg actttggatg gagcaattca acatacagag 480  
 30 aatgggtgat ttccatacac tgaaatgatt gttcatctac cacttggttc catcccaaac 540  
 ccaaaaaaag ttttgatcat cggcgggagga attggtttta cattattcga aatgcttcgt 600  
 tatccttcaa tcgaaaaaat tgacattggt gagatcgatg acgtggtagt tgatgtatcc 660  
 agaaaatfff tcccttatct ggcagctaata ttaacgatc ctctgtgtaac cctagttctc 720  
 ggagatggag ctgcattttg aaaggctgca caagcgggat attatgatgc tattatagtg 780  
 35 gactcttctg atcccatttg tccagcaaaa gatttgtttg agaggccatt ctttgaggca 840  
 gtagccaaag cccttaggcc aggaggagt gtatgcacac aggcctgaaag catttggctt 900  
 catatgcata ttattaagca aatcattgct aactgtcgtc aagtctttaa gggttctgtc 960  
 aactatgctt ggacaaccgc tccaacatat cccaccggtg tgatcgggta tatgctctgc 1020  
 tctactgaag ggccagaagt tgacttcaag aatccagtaa atccaattga caagagaca 1080  
 40 actcaagtca agtccaaatt aggacctctc aagttctaca actctgatat tcacaaagca 1140  
 gcattcattt taccatcttt cgccagaagt atgatcgagt cttaatcaag tgaataatga 1200  
 acactggtag tacaatcatt ggaccaagat cgagtcctaa tcaagtgaat aataagtgta 1260  
 aatgcgagct attgtaggag aattctgcag taattatcat aatttccaat tcacaatcat 1320  
 tgtaaaattc tttctctgtg gtgtttcgta cttaataata aattttcctg ctgaagtttt 1386  
 45 gaatcg 1386

<210> 8  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 50 <213> Nicotiana sp.

<400> 8  
 Met Glu Val Ile Ser Thr Asn Thr Asn Gly Ser Thr Ile Phe Lys Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Ile Pro Met Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu His Leu  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Gln Asn Gly Thr Ser Lys His Gln Asn Gly His Gln Asn  
 35 40 45  
 60 Gly Thr Phe Glu His Arg Asn Gly His Gln Asn Gly Thr Ser Glu Gln

ES 2 543 907 T3

50 55 60  
 Gln Asn Gly Thr Ile Ser His Asp Asn Gly Asn Glu Leu Leu Gly Ser  
 65 70 75 80  
 5 Ser Asp Ser Ile Lys Pro Gly Trp Phe Ser Glu Phe Ser Ala Leu Trp  
 85 90 95  
 Pro Gly Glu Ala Phe Ser Leu Lys Val Glu Lys Leu Leu Phe Gln Gly  
 100 105 110  
 Lys Ser Asp Tyr Gln Asp Val Met Leu Phe Glu Ser Ala Thr Tyr Gly  
 115 120 125  
 10 Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Ala Ile Gln His Thr Glu Asn Gly Gly  
 130 135 140  
 Phe Pro Tyr Thr Glu Met Ile Val His Leu Pro Leu Gly Ser Ile Pro  
 145 150 155 160  
 15 Asn Pro Lys Lys Val Leu Ile Ile Gly Gly Ile Gly Phe Thr Leu  
 165 170 175  
 Phe Glu Met Leu Arg Tyr Pro Ser Ile Glu Lys Ile Asp Ile Val Glu  
 180 185 190  
 Ile Asp Asp Val Val Val Asp Val Ser Arg Lys Phe Phe Pro Tyr Leu  
 195 200 205  
 20 Ala Ala Asn Phe Asn Asp Pro Arg Val Thr Leu Val Leu Gly Asp Gly  
 210 215 220  
 Ala Ala Phe Val Lys Ala Ala Gln Ala Gly Tyr Tyr Asp Ala Ile Ile  
 225 230 235 240  
 25 Val Asp Ser Ser Asp Pro Ile Gly Pro Ala Lys Asp Leu Phe Glu Arg  
 245 250 255 260  
 Pro Phe Phe Glu Ala Val Ala Lys Ala Leu Arg Pro Gly Gly Val Val  
 265 270 275  
 Cys Thr Gln Ala Glu Ser Ile Trp Leu His Met His Ile Ile Lys Gln  
 280 285 290  
 30 Ile Ile Ala Asn Cys Arg Gln Val Phe Lys Gly Ser Val Asn Tyr Ala  
 295 300 305  
 Trp Thr Thr Ala Pro Thr Tyr Pro Thr Gly Val Ile Gly Tyr Met Leu  
 310 315 320  
 35 Cys Ser Thr Glu Gly Pro Glu Val Asp Phe Lys Asn Pro Val Asn Pro  
 325 330 335 340  
 Ile Asp Lys Glu Thr Thr Gln Val Lys Ser Lys Leu Gly Pro Leu Lys  
 345 350 355  
 Phe Tyr Asn Ser Asp Ile His Lys Ala Ala Phe Ile Leu Pro Ser Phe  
 360 365 370  
 40 Ala Arg Ser Met Ile Glu Ser  
 375

<210> 9

<211> 1680

45 <212> ADN

<213> Nicotiana sp.

<400> 9

atgtttccgc tcataattct gatcagcttt tcacttgctt ccttgtctga aactgctact 60  
 50 ggagctgtta caaatctttc agcctgctta atcaaccaca atgtccataa cttctctatt 120  
 taccacacaa gtagaaatta cttaacttgg ctccacttct ccctcaaaa tcttcgcttt 180  
 gctgcacctt tcatgccgaa accaaccttc attatcctac caagcagtaa ggaggagctc 240  
 gtgagcacca ttttttggtg cagaaaagca tcttatgaaa tcagagtaag gtgcccggga 300  
 cacagttacg aaggaacttc ttacgtttcc ttgacgctt ctccattcgt gatcgttgac 360  
 55 ttgatgaaat tagacgacgt ttcagtagat ttggattctg aaacagcttg ggctcagggc 420  
 ggcgcaacaa ttggccaaat ttattatgcc attgccaagg taagtacgt tcatgcattt 480  
 tcagcagggt cgggaccaac agtaggatct ggaggtcata tttcagggtg tggatttgga 540  
 cttttatcta gaaaattcgg acttgctgct gataatgtcg ttgatgctct tcttattgat 600  
 gctgatggac ggttattaga ccgaaaagcc atgggcgaag acgtgttttg ggcaatcaga 660  
 60 ggtggcggcg gtggaattg gggcattggt tatgcttggg aaattcgatt actcaaagtg 720  
 cctaaaatcg taacaacttg tatgatctat aggcctggat ccaaaacaata cgtggctcaa 780

ES 2 543 907 T3

|    |             |             |            |            |             |            |      |
|----|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
|    | atacttgaga  | aatggcaaat  | agttactcca | aatttggtcg | atgattttac  | tctaggagta | 840  |
|    | ctgctgagac  | ctgcagatct  | acccgcggat | atgaaatatg | gtaatactac  | tcctattgaa | 900  |
|    | atatttcccc  | aattcaatgc  | actttatttg | ggtccaaaaa | ctgaagttct  | ttccatatcg | 960  |
|    | aatgagacat  | tcccgagct   | aggcgtaaag | aatgatgagt | gcaaggaaat  | gacttgggta | 1020 |
| 5  | gagtcagcac  | ttttcttctc  | cgaattagct | gacgttaacg | ggaaactcgac | tggtgatatc | 1080 |
|    | tcccgctctga | aagaacgtta  | catggacgga | aaaggttttt | tcaaaggcaa  | aacggactac | 1140 |
|    | gtgaagaagc  | cagtttcaat  | ggatgggatg | ctaacatttc | ttgtggaact  | cgagaaaaac | 1200 |
|    | ccgaagggat  | atcttgtctt  | tgatccttat | ggcggagcca | tggacaagat  | tagtgatcaa | 1260 |
|    | gctattgctt  | tccctcatag  | aaaaggtaac | cttttcgcca | ttcagtatct  | agcacagtgg | 1320 |
| 10 | aatgaagagc  | acgattacat  | gagcgcgctt | tacatggagt | ggataagagg  | atttacaat  | 1380 |
|    | acaatgacgc  | cctttgtttc  | aagctcgcca | agggggactt | atatcaacta  | cttgatgatg | 1440 |
|    | gatcttggag  | tgaatatggt  | cgacgactac | ttattgcaaa | atgctagtag  | cagtagtcct | 1500 |
|    | tcttctctcg  | ttgatgctgt  | ggagagagct | agagcgtggg | gtgagatgta  | tttcttgcac | 1560 |
|    | aactatgata  | ggtttggttaa | agctaagaca | caaattgatc | cactaaatgt  | ttttcgacat | 1620 |
| 15 | gaacagagta  | ttcctcctat  | gcttggttca | acgcaagagc | acaagtatag  | cagtgaatga | 1680 |

<210> 10  
 <211> 933  
 <212> ADN

20 <213> Nicotiana sp.

|    |             |            |             |            |            |            |     |
|----|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
|    | <400>       | 10         |             |            |            |            |     |
|    | atggttgtat  | cagagaaaag | caagatctta  | ataattggag | gcacaggcta | catagaaaaa | 60  |
|    | tacttgggtg  | agacaagtgc | aaaatctggg  | catccaactt | tcgctcttat | cagagaaagc | 120 |
| 25 | acactcaaaa  | accccgagaa | atcaaaaactc | atcgacacat | tcaagagtta | tggggttacg | 180 |
|    | ctactttttg  | gagatatatc | caatcaagag  | agcttactca | aggcaatcaa | gcaagttgat | 240 |
|    | gtggtgattt  | ccactgtcgg | aggacagcaa  | tttactgatc | aagtgaacat | catcaaagca | 300 |
|    | attaaagaag  | ctggaaatat | caagagattt  | cttcttccag | aatttggatt | tgatgtggat | 360 |
|    | catgctcgtg  | caattgaacc | agctgcacta  | ctcttcgctc | taaaggtaag | aatcaggagg | 420 |
| 30 | atgatagagg  | cagaaggaat | tccatacaca  | tatgtaatct | gcaattgggt | tgcagatttc | 480 |
|    | ttcttgccca  | acttggggca | gttagaggcc  | aaaaccctc  | ctagagacaa | agttgtcatt | 540 |
|    | tttggcgatg  | gaaatcccaa | agcaatatat  | gtgaaggaag | aagacatagc | gacatacact | 600 |
|    | atcgaagcag  | tagatgatcc | acggacattg  | aataagactc | ttcacatgag | accacctgcc | 660 |
|    | aatattctat  | ccttcaacga | gatagtgtcc  | ttgtgggagg | acaaaattgg | gaagaccctc | 720 |
| 35 | gagaagttat  | atctatcaga | ggaagatatt  | ctccagattg | tacaagaggg | acctctgcca | 780 |
|    | ttaaaggacta | atttggccat | atgccattca  | gtttttgtta | atggagattc | tgcaaacctt | 840 |
|    | gaggttcagc  | ctcctacagg | tgtcgaagcc  | actgagctat | atccaaaagt | gaaatacaca | 900 |
|    | accgtcgacg  | agttctacaa | caaatttgtc  | tag        |            |            | 933 |

40 <210> 11  
 <211> 1056  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

|    |             |             |             |             |             |             |     |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| 45 | <400>       | 11          |             |             |             |             |     |
|    | atgttttagag | ctatttcttt  | cactgctaca  | gtgcatcctt  | atgcaattac  | agctccaagg  | 60  |
|    | ttggtgggtga | aaatgtcagc  | aatagccacc  | aagaatacaa  | gagtgaggtc  | attagagggtg | 120 |
|    | aaaccaccag  | cacaccaaac  | ttatgattta  | aaggaaagtt  | tgaaacttgc  | actctctgaa  | 180 |
|    | gatgctggga  | atrttaggaga | tgtgacttgt  | aaggcgacaa  | ttcctcttga  | tatggaatcc  | 240 |
| 50 | gatgctcatt  | ttctagcaaa  | ggaagacggg  | atcatagcag  | gaattgcact  | tgctgagatg  | 300 |
|    | atattcgcgg  | aagttgatcc  | ttcattaaag  | gtggagtggg  | atgtaaataga | tggcgataaa  | 360 |
|    | gttcataaag  | gcttgaat    | tggcaaaagta | caaggaaaacg | cttacaacat  | tgttatagct  | 420 |
|    | gagagggttg  | ttctcaattt  | tatgcaaaga  | atgagtggaa  | tagctacact  | aactaaggaa  | 480 |
|    | atggcagatg  | ctgcacacc   | tgcttacatc  | ttggagacta  | ggaaaactgc  | tccttgatta  | 540 |
| 55 | cgtttgggtg  | ataaatgggc  | ggtattgatc  | ggtgggggga  | agaatcacag  | aatgggctta  | 600 |
|    | tttgatatgg  | taatgataaa  | agacaatcac  | atatctgctg  | ctggagggtg  | cggcaaagct  | 660 |
|    | ctaaaatctg  | tggatcagta  | tttggagcaa  | aataaaactt  | aaataggggt  | tgaggttgaa  | 720 |
|    | accaggacaa  | ttgaagaagt  | acgtgagggt  | ctagactatg  | catctcaaac  | aaagacttcg  | 780 |
|    | ttgactagga  | taatgtctga  | caatatggtt  | gntccattat  | ctaacggaga  | tattgatgta  | 840 |
| 60 | tccatgctta  | aggaggctgt  | agaattgatc  | aatgggaggg  | ttgatacggg  | ggcttcagga  | 900 |
|    | aatgttacc   | ttgaaacagt  | acacaagatt  | ggacaaaactg | gtgttaccta  | catttctagt  | 960 |

ES 2 543 907 T3

ggtgccctga cgcattccgt gaaagcactt gacatttccc tgaagatcga tacagagctc 1020  
 gcccttgaag atggaaggcg tacaacacga gcatga 1056

<210> 12  
 5 <211> 1128  
 <212> ADN  
 <213> Nicotiana sp.

<400> 12  
 10 atggaagtca tatctaccaa cacaaatggc tctaccatct tcaagaatgg tgccattccc 60  
 atgaacggcc accaaaatgg cacttctgaa cacctcaacg gctaccagaa tggcacttcc 120  
 aaacacccaaa acgggcacca gaatggcact ttcgaacatc ggaacggcca ccagaatggg 180  
 acatccgaac aacagaacgg gacaatcagc catgacaatg gcaacgagct actgggaagc 240  
 tccgactcta ttaagcctgg ctggttttca gagtttagcg cattatggcc aggtgaagca 300  
 15 ttctcactta aggttgagaa gttactattc caggggaagt ctgattacca agatgtcatg 360  
 ctctttgagt cagcaactta tgggaagggt ctgactttgg atggagcaat tcaacataca 420  
 gagaatggtg gatttccata cactgaaatg attgttcatc taccacttgg ttccatccca 480  
 aacccaaaaa aggttttgat catcggcgga ggaattgggt ttacattatt cgaaatgctt 540  
 cgttatcctt caatcgaaaa aattgacatt gttgagatcg atgacgtggt agttgatgta 600  
 20 tccagaaaaat ttttccctta tctggcagct aattttaacg atcctcgtgt aaccctagtt 660  
 ctccggagatg gagctgcatt tgtaaaggct gcacaagcgg gatattatga tgctattata 720  
 gtggactctt ctgatcccat tgggccagca aaagatttgt ttgagaggcc attctttgag 780  
 gcagtagcca aagcccttag gccaggagga gttgtatgca cacaggctga aagcatttgg 840  
 cttcatatgc atattattaa gcaaatcatt gctaactgtc gtcaagtctt taagggttct 900  
 25 gtcaactatg cttggacaac cgctccaaca tatcccaccg gtgtgatcgg ttatatgctc 960  
 tgctctactg aagggccaga agttgacttc aagaatccag taaatccaat tgacaaagag 1020  
 acaactcaag tcaagtccaa attaggacct ctcaagtctt acaactctga tattcacaaa 1080  
 gcagcattca ttttaccatc tttcgccaga agtatgatcg agtcttaa 1128

30 <210> 13  
 <211> 538  
 <212> PRT  
 <213> Eschscholzia californica

35 <400> 13

40

45

50

55

60

ES 2 543 907 T3

Met Glu Asn Lys Thr Pro Ile Phe Phe Ser Leu Ser Ile Phe Leu Ser  
 1 5 10 15  
 5 Leu Leu Asn Cys Ala Leu Gly Gly Asn Asp Leu Leu Ser Cys Leu Thr  
 20 25 30  
 10 Phe Asn Gly Val Arg Asn His Thr Val Phe Ser Ala Asp Ser Asp Ser  
 35 40 45  
 15 Asp Phe Asn Arg Phe Leu His Leu Ser Ile Gln Asn Pro Leu Phe Gln  
 50 55 60  
 20 Asn Ser Leu Ile Ser Lys Pro Ser Ala Ile Ile Leu Pro Gly Ser Lys  
 65 70 75 80  
 25 Glu Glu Leu Ser Asn Thr Ile Arg Cys Ile Arg Lys Gly Ser Trp Thr  
 85 90 95  
 30 Ile Arg Leu Arg Ser Gly Gly His Ser Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Thr  
 100 105 110  
 35 Ser Asp Thr Pro Phe Ile Leu Ile Asp Leu Met Asn Leu Asn Arg Val  
 115 120 125  
 40 Ser Ile Asp Leu Glu Ser Glu Thr Ala Trp Val Glu Ser Gly Ser Thr  
 130 135 140  
 45 Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Thr Glu Ser Ser Ser Lys Leu Gly  
 145 150 155 160

50

55

60

ES 2 543 907 T3

Phe Thr Ala Gly Trp Cys Pro Thr Val Gly Thr Gly Gly His Ile Ser  
 165 170 175  
 Gly Gly Gly Phe Gly Met Met Ser Arg Lys Tyr Gly Leu Ala Ala Asp  
 5 180 185 190  
 Asn Val Val Asp Ala Ile Leu Ile Asp Ala Asn Gly Ala Ile Leu Asp  
 10 195 200 205  
 Arg Gln Ala Met Gly Glu Asp Val Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Gly  
 15 210 215 220  
 Gly Gly Val Trp Gly Ala Ile Tyr Ala Trp Lys Ile Lys Leu Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Val Pro Glu Lys Val Thr Val Phe Arg Val Thr Lys Asn Val Ala Ile  
 20 245 250 255  
 Asp Glu Ala Thr Ser Leu Leu His Lys Trp Gln Phe Val Ala Glu Glu  
 25 260 265 270  
 Leu Glu Glu Asp Phe Thr Leu Ser Val Leu Gly Gly Ala Asp Glu Lys  
 275 280 285  
 Gln Val Trp Leu Thr Met Leu Gly Phe His Phe Gly Leu Lys Thr Val  
 30 290 295 300  
 Ala Lys Ser Thr Phe Asp Leu Leu Phe Pro Glu Leu Gly Leu Val Glu  
 35 305 310 315 320  
 Glu Asp Tyr Leu Glu Met Ser Trp Gly Glu Ser Phe Ala Tyr Leu Ala  
 325 330 335  
 Gly Leu Glu Thr Val Ser Gln Leu Asn Asn Arg Phe Leu Lys Phe Asp  
 340 345 350  
 Glu Arg Ala Phe Lys Thr Lys Val Asp Leu Thr Lys Glu Pro Leu Pro  
 355 360 365  
 Ser Lys Ala Phe Tyr Gly Leu Leu Glu Arg Leu Ser Lys Glu Pro Asn  
 370 375 380  
 Gly Phe Ile Ala Leu Asn Gly Phe Gly Gly Gln Met Ser Lys Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Phe Thr Pro Phe Pro His Arg Ser Gly Thr Arg Leu Met Val  
 405 410 415  
 60



|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 15<br>gatcaagcta ttgctttccc t                             | 21 |
| 5  | <210> 16<br><211> 37<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 10 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
|    | <400> 16<br>aaaaagcagg ctcacatgt ttccgctcat aattctg             | 37 |
| 15 | <210> 17<br><211> 34<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 20 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
|    | <400> 17<br>25 agaaagctgg gttcattcac tgctatactt gtgc            | 34 |
|    | <210> 18<br><211> 29<br><212> ADN                               |    |
| 30 | <213> Secuencia artificial                                      |    |
|    | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 35 | <400> 18<br>ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct                     | 29 |
|    | <210> 19<br><211> 29  |    |
| 40 | <212> ADN<br><213> Secuencia artificial                         |    |
|    | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 45 | <400> 19<br>ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt                     | 29 |
|    | <210> 20  |    |
| 50 | <211> 31<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial             |    |
|    | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 55 | <400> 20<br>aaagcttggg aacatattca atacattgta g                  | 31 |
| 60 | <210> 21<br><211> 28  |    |

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Cebador sintético  
 <400> 21  
 tctagattct actactatuu tataagtg 28  
 10 <210> 22  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 22  
 aaaaagcagg ctuagaagga gatagaacca tggttgtatc agagaaaagc a 51  
 20 <210> 23  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 23  
 30 agaaagctgg gtcctagaca aatttgttgt agaactcgtc g 41  
 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 40 <400> 24  
 aaaagcttag atctctctta tgtttcatg 29  
 <210> 25  
 <211> 35  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 50 <400> 25  
 tctagattta ctctagggg aagaaaaaaa gtagc 35  
 <210> 26  
 55 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador sintético

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <400> 26<br>aaaaagcagg ctcaaaaatg gaagtcatat c                  | 31 |
| 5  | <210> 27<br><211> 32<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 10 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
|    | <400> 27<br>agaaagctgg gtttaagact cgatcatact tc                 | 32 |
| 15 | <210> 28<br><211> 21<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 20 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 25 | <400> 28<br>caccatgttt agagctattc c                             | 21 |
| 30 | <210> 29<br><211> 20<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 35 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 40 | <400> 29<br>tcatgctcgt tttgtacgcc                               | 20 |
| 45 | <210> 30<br><211> 22<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 50 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 55 | <400> 30<br>acccttcctc tatataagga ag                            | 22 |
| 60 | <210> 31<br><211> 24<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial |    |
| 65 | <220><br><223> Cebador sintético                                |    |
| 70 | <400> 31<br>tgagcccaag ctgtttcaga atcc                          | 24 |
| 75 | <210> 32<br><211> 22<br><212> ADN                               |    |

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador sintético  
5 <400> 32  
acccttcctc tatataagga ag 22  
  
<210> 33  
10 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
15 <223> Cebador sintético  
  
<400> 33  
cgctaaactc tgaaaaccag c 21

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, que comprende sobreexpresar un gen *NBB1* en relación con una planta de control, en el que dicho gen *NBB1* es una secuencia de ácido nucleico que  
5 codifica el polipéptido en la SEQ ID NO: 2.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende además sobreexpresar el gen *A622*.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, que comprende además sobreexpresar al menos uno de los genes *QPT*  
10 y *PMT*.
4. Procedimiento para incrementar la nicotina en una planta de *Nicotiana*, según la reivindicación 1, que comprende:  
(a) transformar una planta de *Nicotiana* con una construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un promotor  
unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis de nicotina;  
15 en el que dicho ácido nucleico es el gen *NBB1* y se sobreexpresa el gen *NBB1*;  
(b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y  
(c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina en relación con una  
planta de control.
- 20 5. Procedimiento para incrementar la nicotina y el rendimiento en una planta de *Nicotiana*, según la reivindicación 1,  
que comprende:  
(a) transformar una planta de *Nicotiana* con (i) una primera construcción que comprende, en la dirección 5' a 3', un  
promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima que incrementa la síntesis  
de nicotina; y (ii) una segunda construcción que comprende,  
25 en la dirección 5' a 3', un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una enzima  
que incrementa el rendimiento;  
en el que dicha primera construcción comprende un ácido nucleico que codifica la enzima *NBB1* y se sobreexpresa  
el gen *NBB1*;  
(b) regenerar plantas de *Nicotiana* transgénicas a partir de la planta transformada; y  
30 (c) seleccionar una planta de *Nicotiana* transgénica que tiene un mayor contenido de nicotina y un mayor  
rendimiento en relación con una planta de control.
6. Planta de *Nicotiana* que sobreexpresa el gen *NBB1* en relación con una planta de control, en el que dicho gen  
*NBB1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido en la SEQ ID NO: 2.  
35
7. Utilización de la planta, tal como se define en la reivindicación 6, para producir un producto con mayor nicotina, en  
la que dicho producto tiene mayores niveles de *NBB1*.
8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un  
40 cigarrillo, un producto farmacéutico y un producto nutracéutico.

# Figura 1

Análisis de transferencia de ARN de la expresión de NBB1

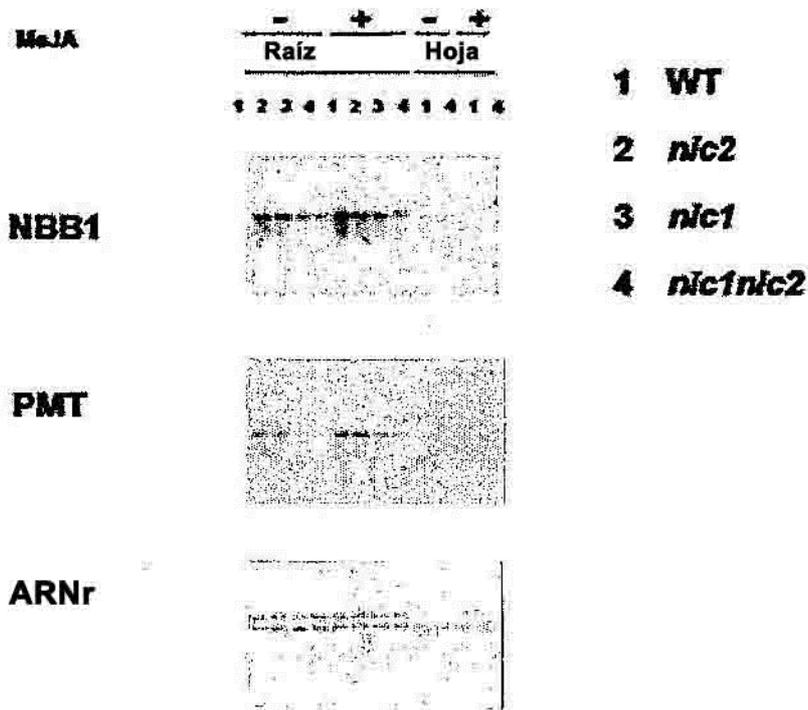


Figura 2

Alineamiento de NBB1 con la enzima del puente de la berberina de *Eschscholzia californica* (EcBBE)

```

NBB1      1  ...MFPILILISPLASLSSEETAGAVINLSACLKRNVRNPFSEIVTSRN..YFNLLHPFSL 55
EcBBE     1  HENYTPAFPSESETEPLSLNCAEGE-NDLSCLTFENGVERNNTVFSADSDSDPNRFLHLSI 58

56  QNREFAAPFMPKAPFPTMILPSSKEELVSTIFCCRRKASNETEIVZCOGHSEYEGTSYVSDASP 115
59  QNPLEQNLSLISKPSAILLEPGKKEELSNTIRGTRKNSMTIRLXSSGGHSYEGLSYTSI..DTP 116

116  FVIYDLRLLDDVSVLDSETAWAQQGATLGGIYIYAIKVSQVHAFSAGGFTVGSGGHIS 175
117  FLLIDLNANRNSDLESETAWVESGSLGSELYAIPESSSKLGEIAGWCPTVGTGGHIS 176

176  GCGFGVLSRNFGLAANDRVVDALIDADQRELDRAKNGEDVFWAIRGGGGNMGHIVANKI 235
177  GCGFGHRSRKYGLAADRVVDALIDANGAIIDROANGEDVFWAIRGGGGQVNGAIVANKI 236

236  RLLKVPKINVTTCMIYRPGSKQYVAQILEKNGIYVTPNIVDDPTLQVLDLRPADLPADKRYGN 295
237  KLLPVPFKVTVPRVTKNVAIDEATSLKAKHQFVAEELEEDFTLSVL.....GG 284

296  TTRIEIFQPNALYLGKXTPEVLSISNETFPELGVKNDCKENQVESALFFSELDVHGH 355
285  ADRKQVHLTHLGFNGKXTVAKSFFDLDFPELGLVPEDYLEMSSGES..KAYLAGLE. 339

356  STGDISLKERVMD·QKGFKGNVYVXKPVSHDGHLTFLVLEFVHFXGLVLPDPYGGAV 414
340  ..TVSOLNNEFLKFDERAFKQVDTKVELEPKAFYGLLERLSYFPPNGPIALNGPQGM 396

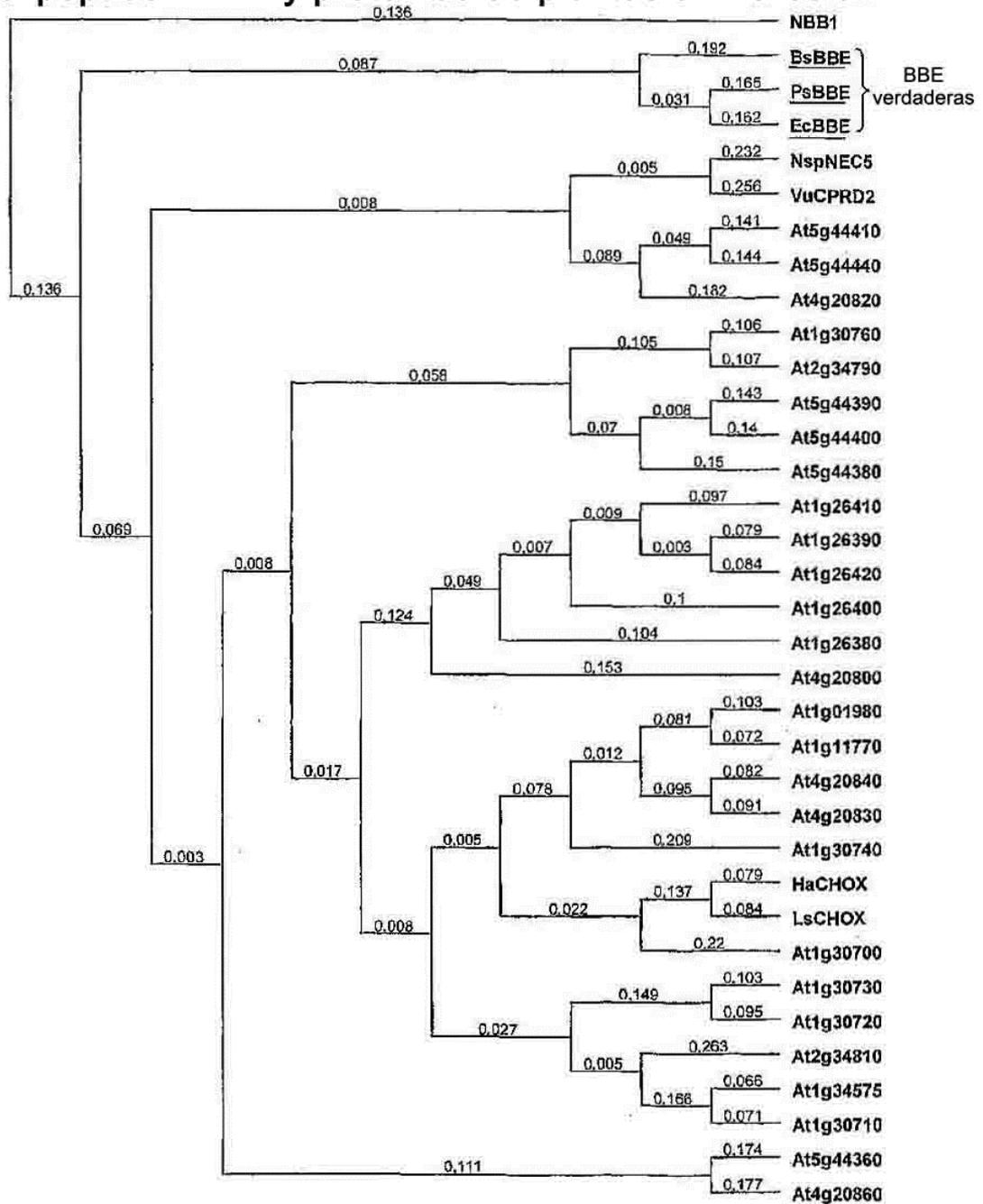
415  DKISDQALAEPIHRKGLLEAIOVLAQNHZEEDDYSQVYHEWRGFVYVNTTSPVSSSPRGNV 474
397  SKISSDFEPPNRSQERLKVETVANNQSEOKKTEFLDWLEKVVDFMKPFYSKNPELGLY 456

475  INYLDNDLGNRVVDYLLRNASSSSPSSVDAVERARANGEMVFNMYDRLVKAKTQIDP 534
457  VNHIDPLEGSDMGNKTVVNHAIELRSWGESYELSNYERLIRAKTLIDENNVFNHPOSI 516

535  LNVPRHEQSIPLMLGSTQEFKYSSE
517  PPNANFDYLEKTLGSDGGENVI...
    
```

**Figura 3**

**Árbol filogenético construido con las secuencias del polipéptido NBB1 y proteínas de plantas similares a BBE**

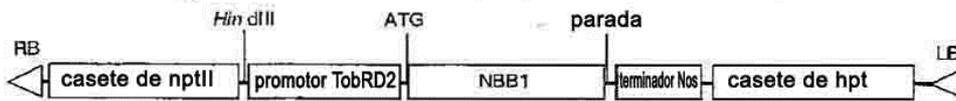


## Figuras 4A-4F

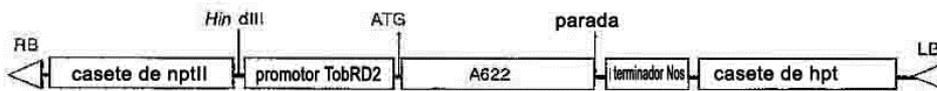
**Figura 4A** Región de ADN-T de pTobRD2-DEST



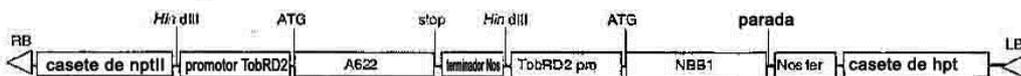
**Figura 4B** Región de ADN-T de pTobRD2-NBB1ox



**Figura 4C** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox



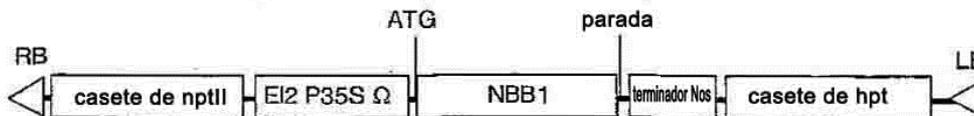
**Figura 4D** Región de ADN-T de pTobRD2-A622ox-NBB1ox



**Figura 4E** Región de ADN-T de pBI101H-E2113-DEST

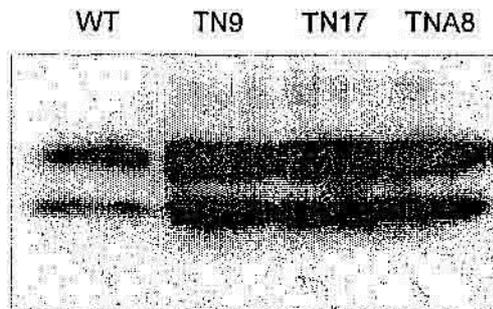


**Figura 4F** Región de ADN-T de pEI235SΩ-NBB1

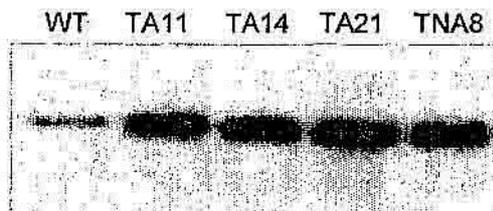


## Figuras 5A y 5B

**Figura 5A** Análisis de inmunotransferencia de NBB1

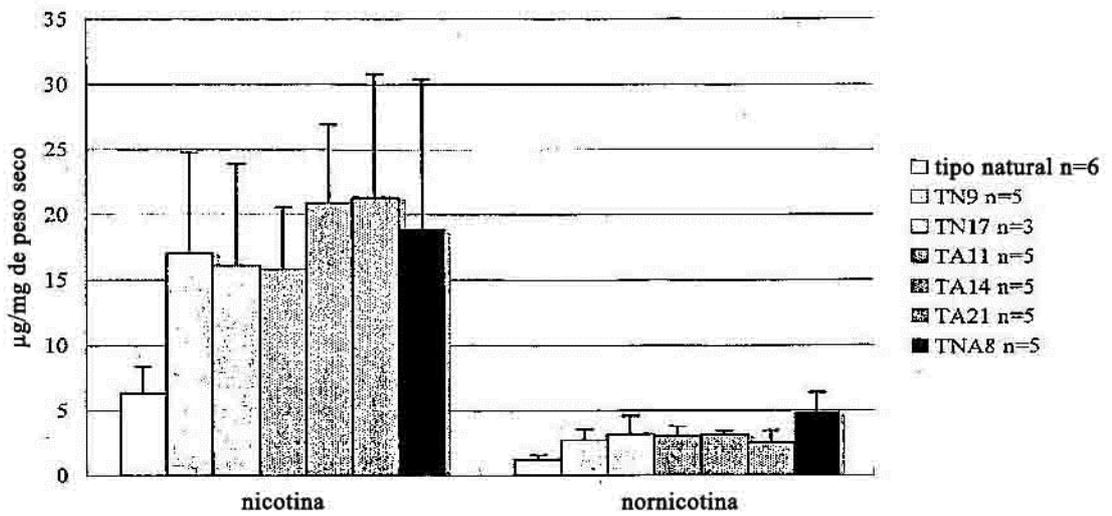


**Figura 5B** A622 en raíces capilares de tabaco



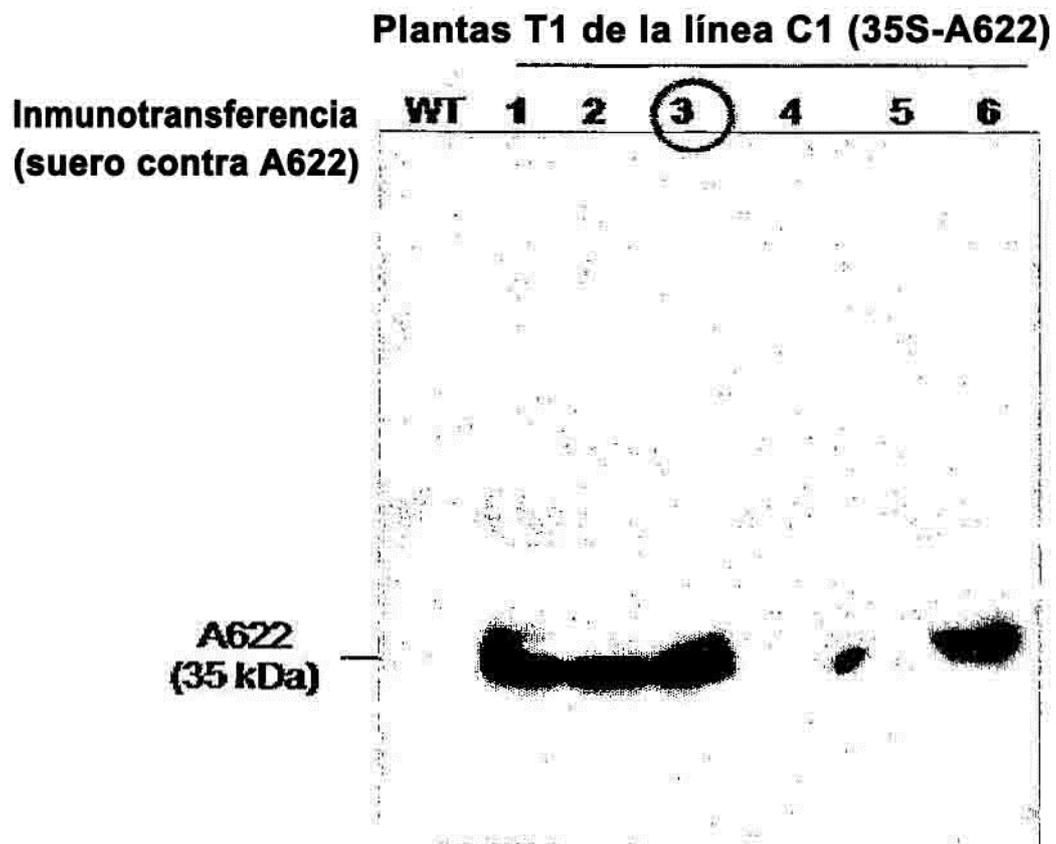
### Figura 6

Contenido de alcaloides nicotínicos en raíces capilares de TobRD2-NBB1 (TN), TobRD2-A622 (TA) y TobRD2-NBB1-A622 (TNA)



## Figura 7

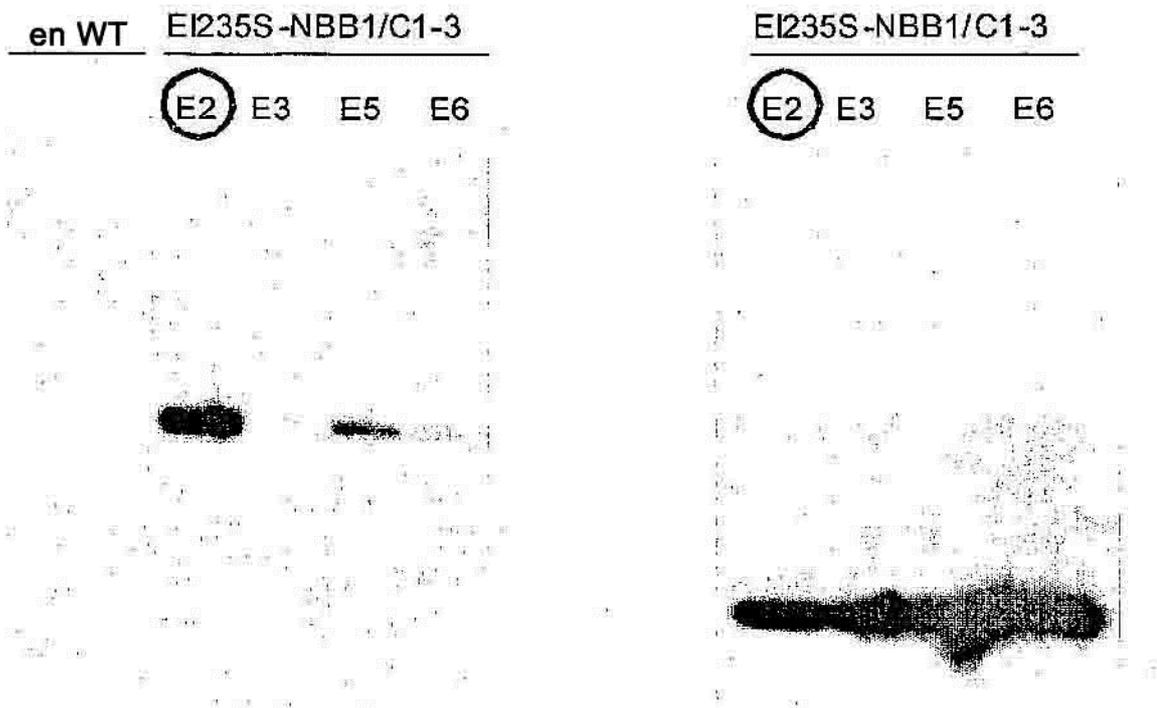
Expresión de la proteína A622 en plantas transgénicas de *A. belladonna*



## Figura 8

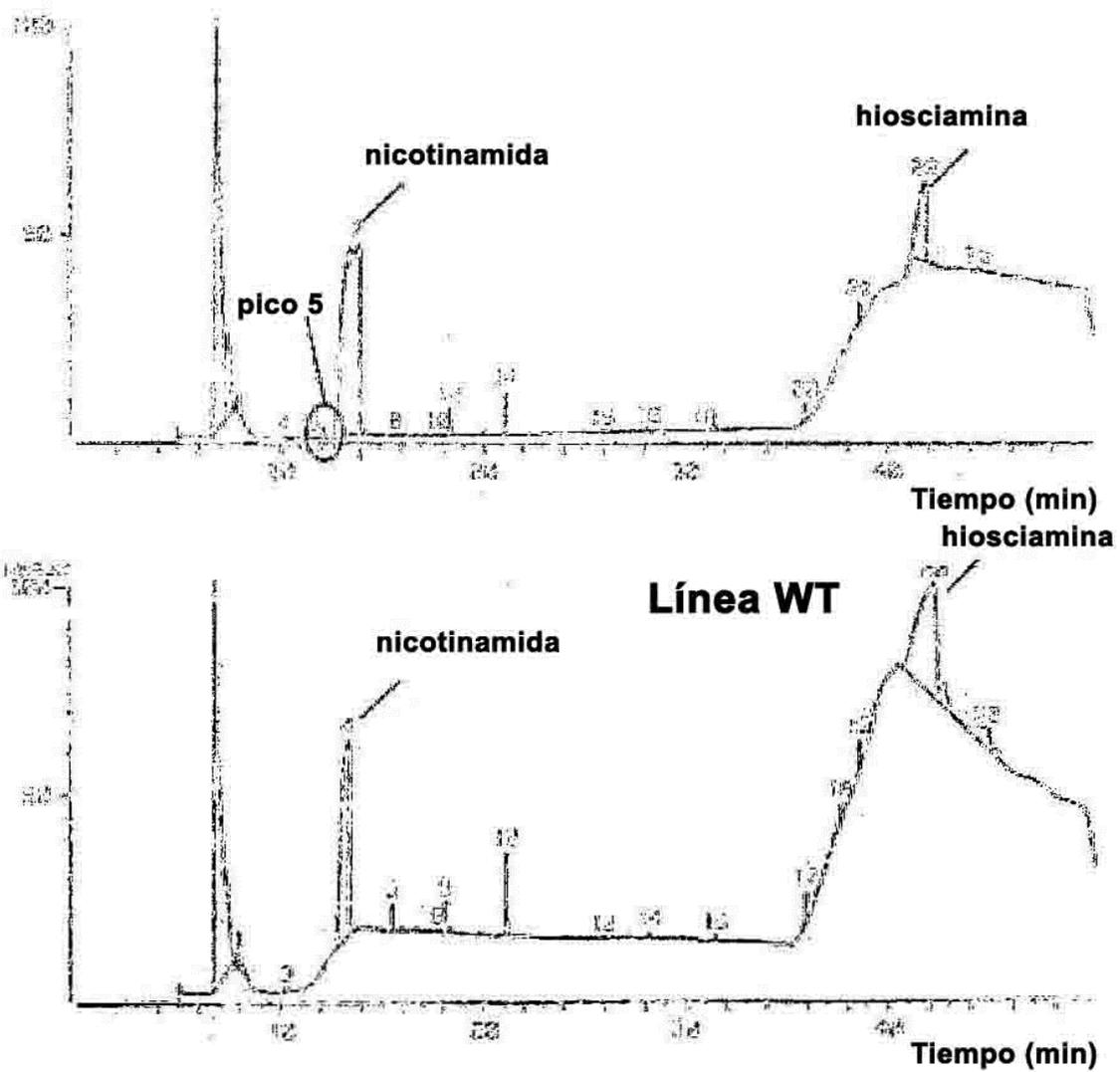
### Plantas transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

Inmunotransferencia (suero contra NBB1 / A622)      Inmunotransferencia (suero contra NBB1 / A622)



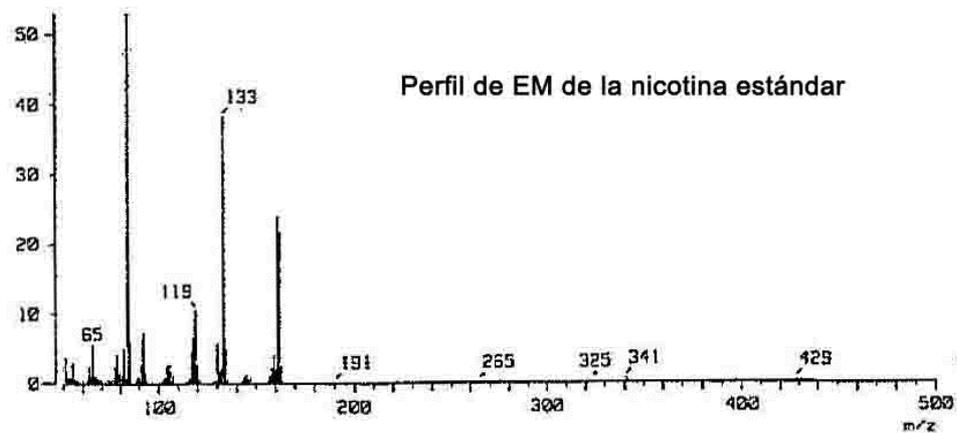
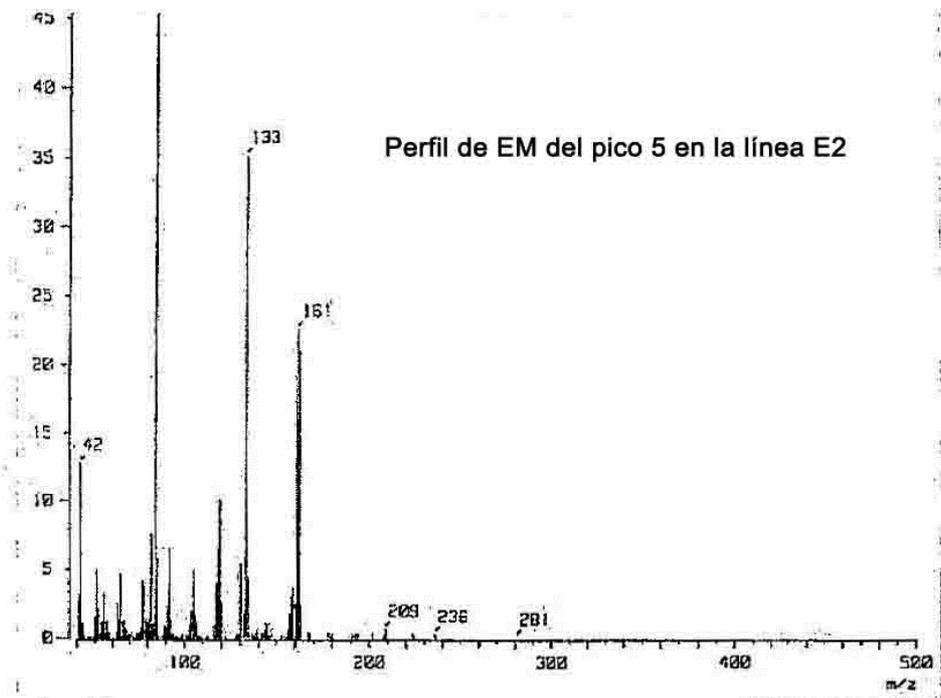
### Figura 9

Síntesis de nicotina en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622



### Figura 10

Perfil de EM de la nicotina sintetizada en raíces capilares transgénicas de *A. belladonna* que expresan NBB1 y A622

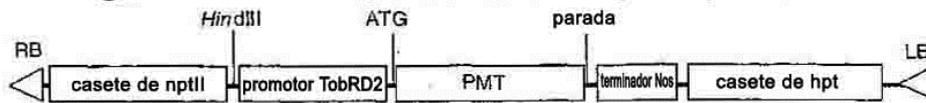


## Figuras 11A-11G

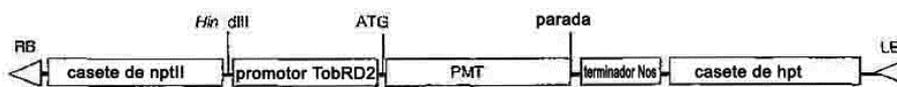
**Figuras 11A** Región de ADN-T de pA622pro-DEST



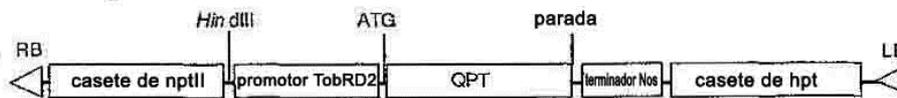
**Figuras 11B** Región de ADN-T de pA622pro-PMTox



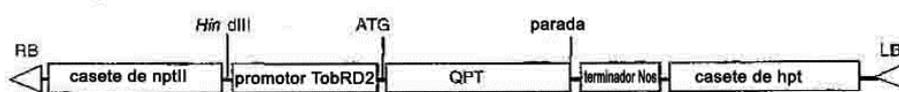
**Figuras 11C** Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox



**Figuras 11D** Región de ADN-T de pA622pro-QPTox



**Figuras 11E** Región de ADN-T de pTobRD2-QPTox



**Figuras 11F** Región de ADN-T de pA622proPMTox-QPTox

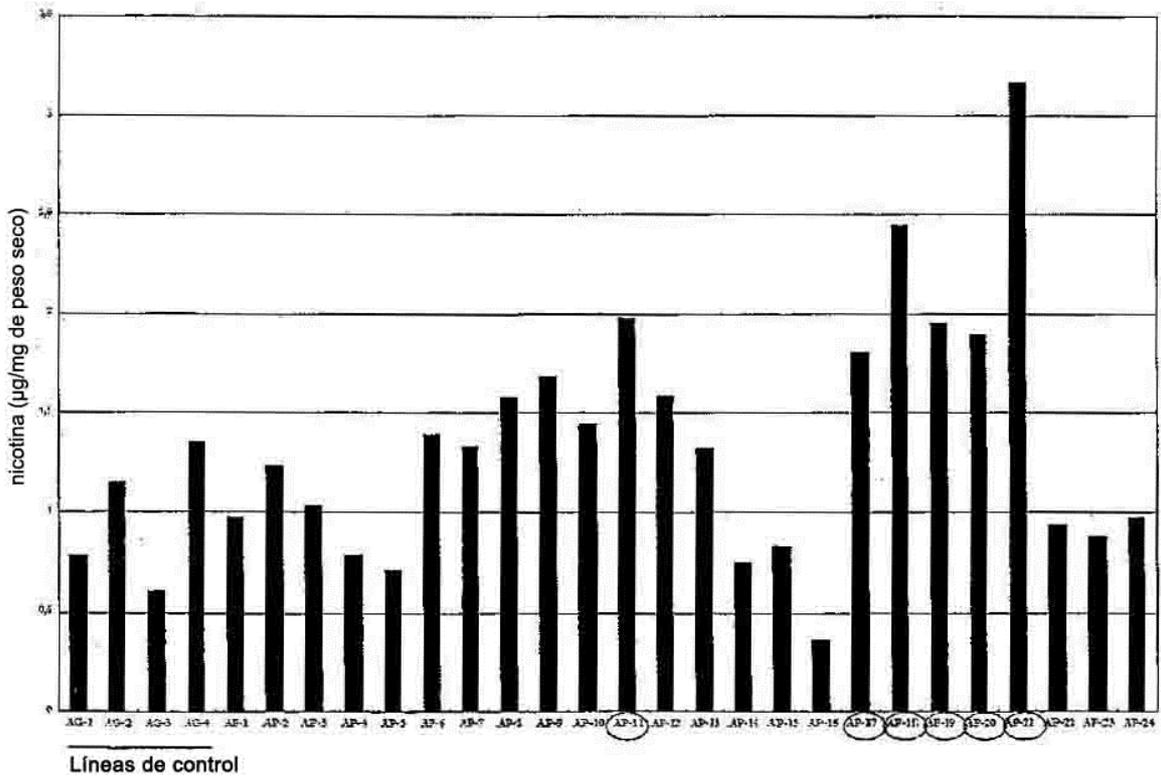


**Figuras 11G** Región de ADN-T de pTobRD2-PMTox-QPTox



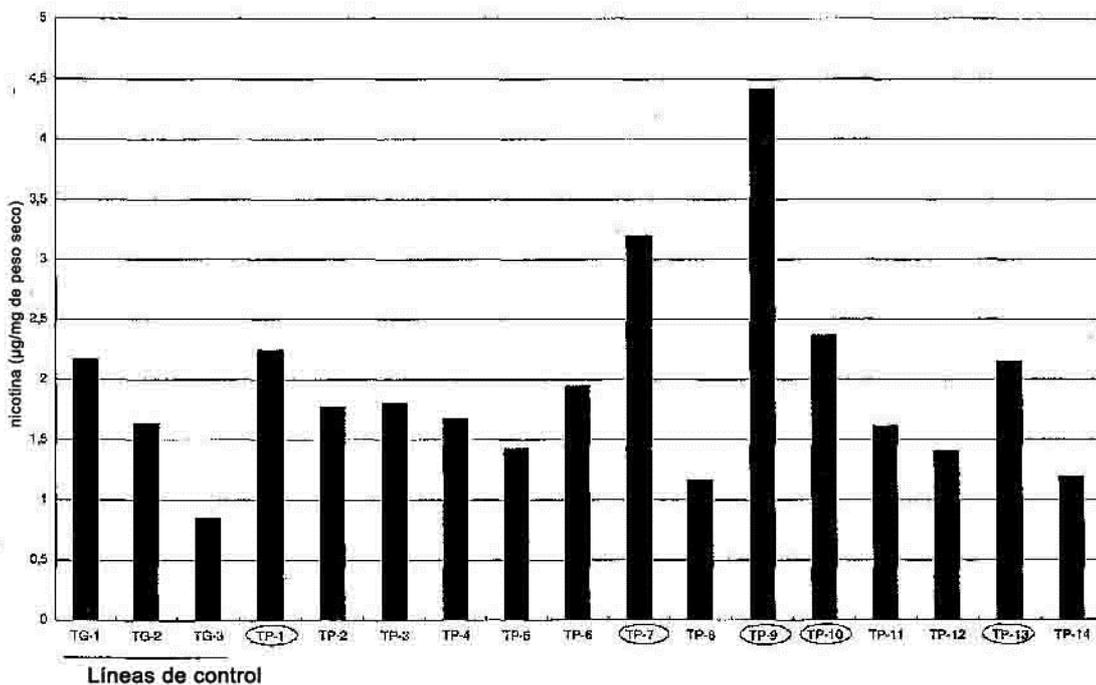
**Figura 12**

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox (AP-1 a AP-24). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS.



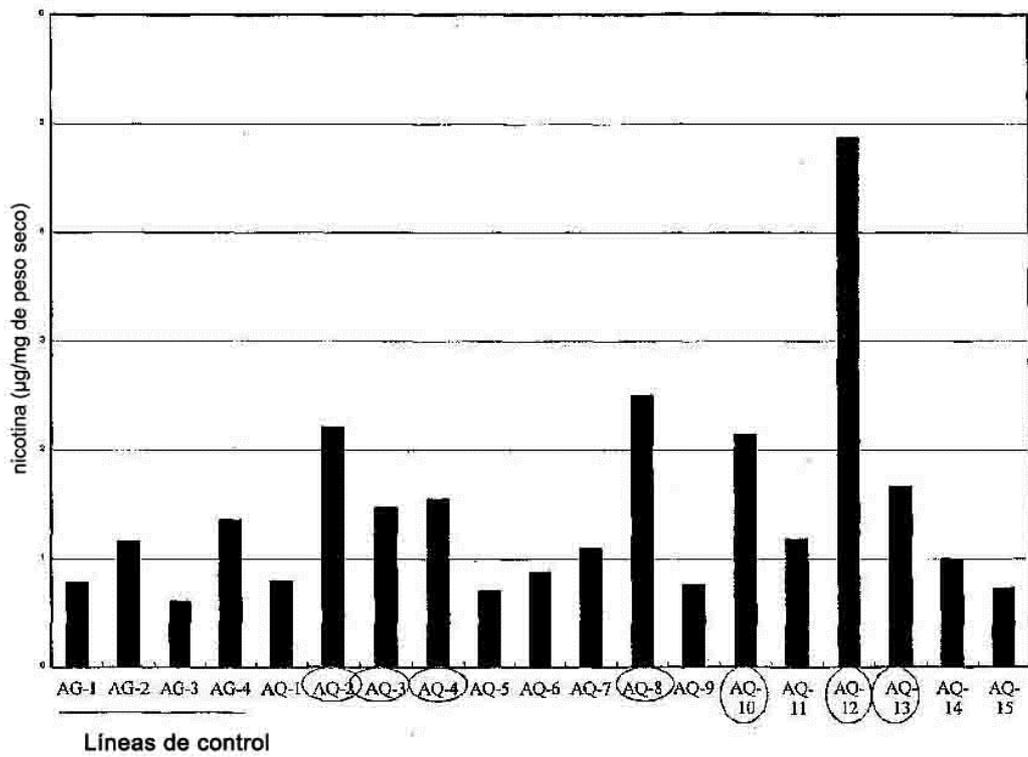
### Figura 13

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-PMTox (TP-1 a TP-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.



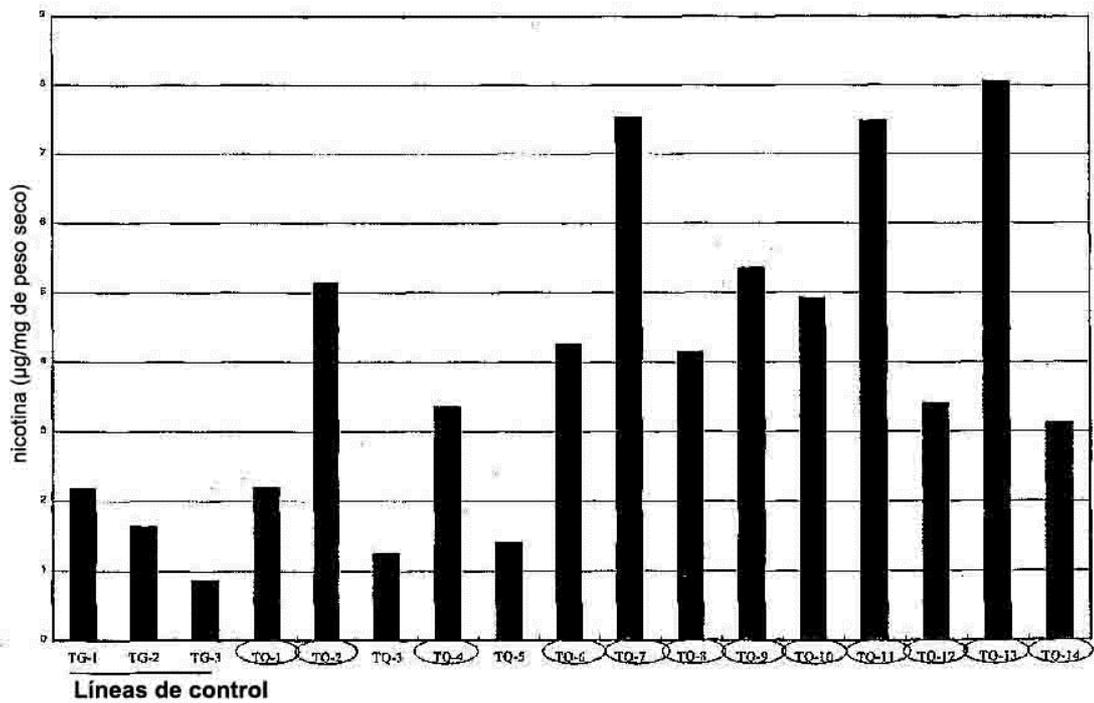
**Figura 14**

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-QPTox (AQ-1 a AQ-15). AG-1 a AG-4 son plantas de control transformadas con A622-GUS



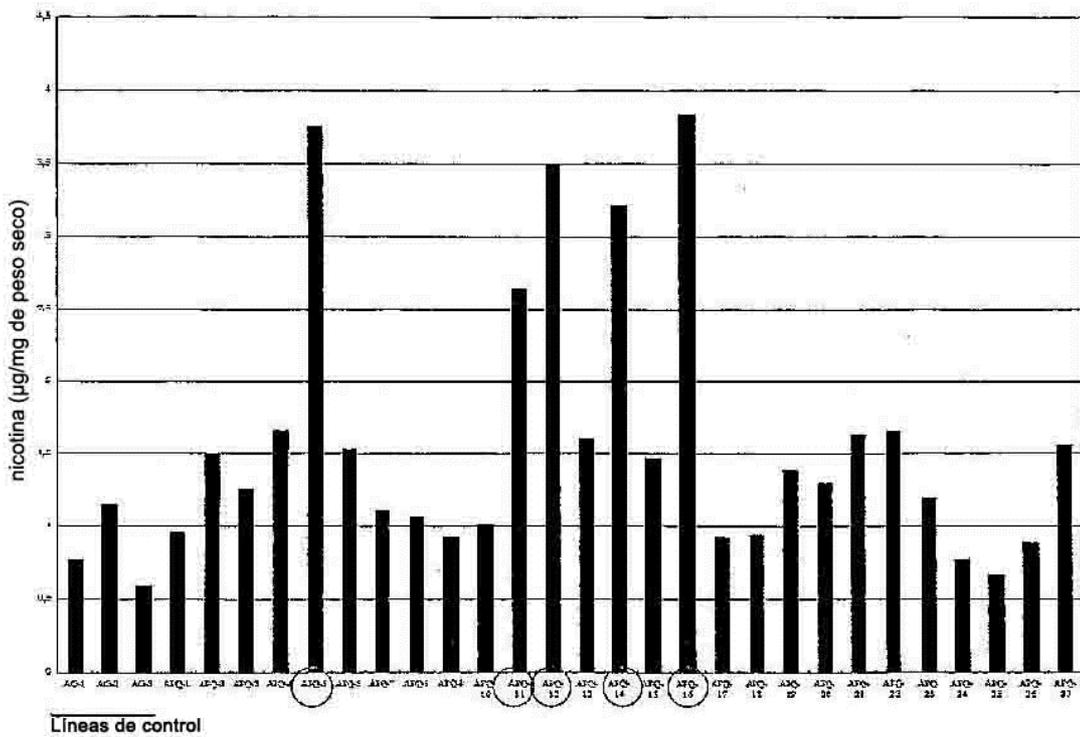
**Figura 15**

**Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con TobRD2-QPTox (TQ-1 a TQ-14). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS nicotina**



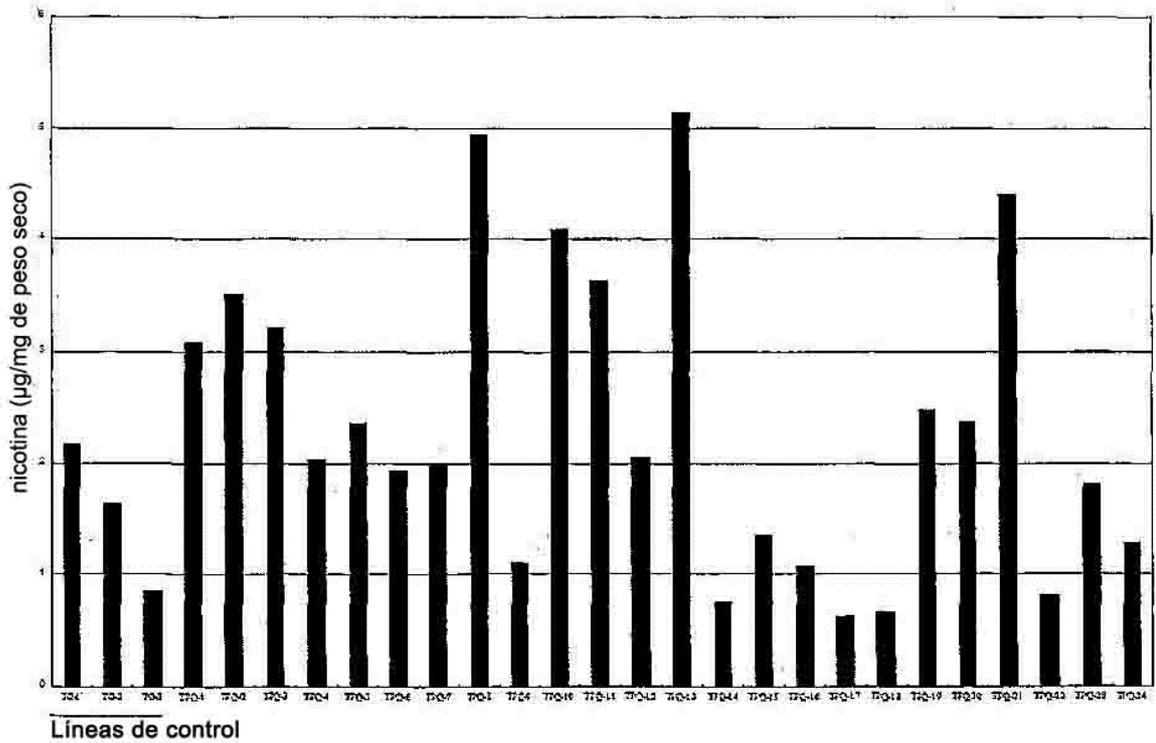
### Figura 16

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con A622pro-PMTox-QPTox (APQ-1 a APQ-27). AG-1 a AG-3 son plantas de control transformadas con A622-GUS.



### Figura 17

Contenido de nicotina en hojas de plantas de tabaco transformadas con pTobRD2-PMTox-QPTox (TPQ-1 a TPQ-24). TG-1 a TG-3 son plantas de control transformadas con TobRD2-GUS.

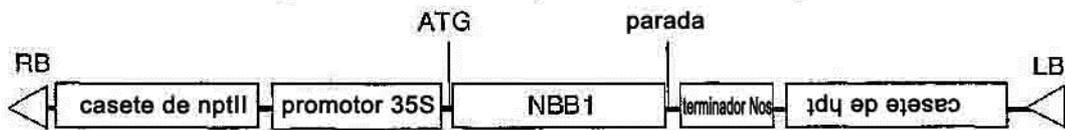


## Figuras 18A-18C

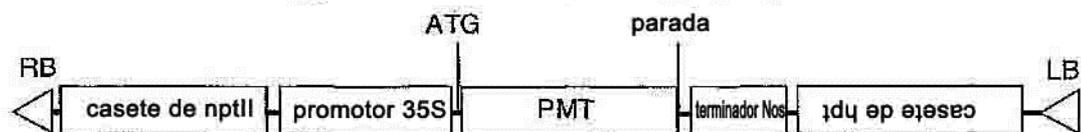
**Figura 18A** Región de ADN-T de pGWB2



**Figura 18B** Región de ADN-T de p35S-NBB1

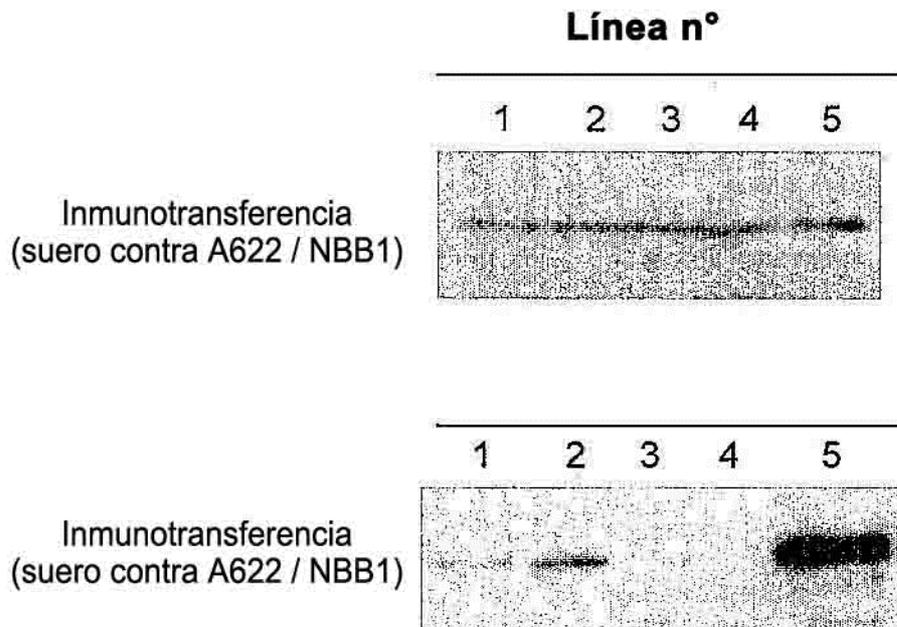


**Figura 18C** Región de ADN-T de p35S-PMT



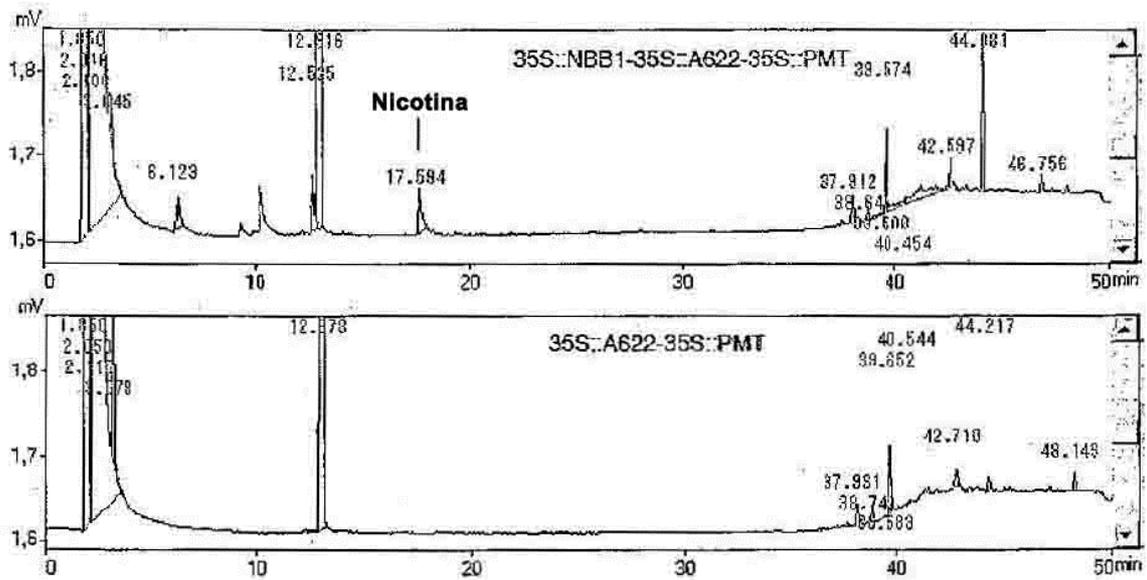
## Figura 19

Análisis de inmunotransferencia de líneas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con casetes de 35S-A622-35S-NBB1-35S-PMT



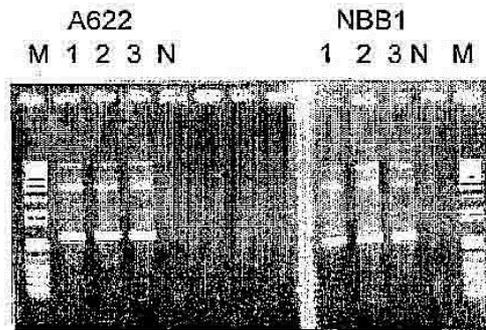
**Figura 20**

Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que coexpresan NBB1, A622 y PMT



## Figuras 21A-21B

**Figura 21A** Confirmación de la presencia de A622 y NBB1 en báculos recombinantes



**Figura 21B** Detección de A622 y NBB1 en células Sf9 de insectos infectadas y eluatos de columnas de Ni-NTA

