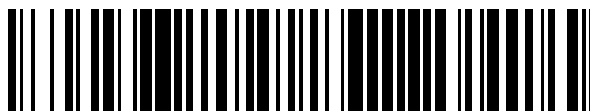


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 067**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/14 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2003 E 10186182 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2395083**

54 Título: **Plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína y método relacionado**

30 Prioridad:

08.01.2002 US 346541 P

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

21.07.2017

73 Titular/es:

**AGRIVIDA, INC. (100.0%)
200 Boston Avenue, Suite 2975
Medford, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

RAAB, MICHAEL, R.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 626 067 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

Plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína y método relacionado

Antecedentes

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína, a métodos para la producción de las plantas transgénicas, a métodos para la expresión en plantas de proteínas modificadas con SPIC o inteína, y a diversos usos de y a productos que contienen las plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína.

Descripción de los antecedentes

- 10 Dado que los combustibles fósiles son recursos no renovables, para el futuro se requiere garantizar suministros adecuados de energía y de materias básicas orgánicas. Una transición a los recursos sostenibles requiere nuevas tecnologías para la construcción de materias básicas mejoradas, el diseño de procesos eficientes para convertir las materias básicas en productos valiosos y/o el diseño de productos que utilicen eficientemente un espectro de sustratos modificados. Esta transformación creará beneficios tales como menor contaminación de la producción y
- 15 uso de la energía, menor contaminación de los procesos de fabricación de productos químicos, mayor sostenibilidad a través de la utilización de fuentes naturales renovables y de productos residuales orgánicos como sustratos, menor dependencia de materiales primas de países extranjeros y aumento en la economía local y mercados implicados en la producción de nuevos sustratos.

- 20 La biomasa vegetal es un recurso sostenible que puede ayudar a atender las necesidades futuras de las materias básicas. El uso de las plantas como sustratos para energía, productos químicos, productos farmacéuticos y materias básicas orgánicas se beneficia de la producción agrícola a gran escala, usa la energía solar para incorporar el dióxido de carbono en las plantas mediante la fotosíntesis y tiene escasos subproductos ambientalmente tóxicos. Mediante el uso de la fotosíntesis, las plantas fabrican el dióxido de carbono eliminado del aire disponible para la producción de energía, productos químicos y productos agrícolas. La búsqueda de modos para redistribuir eficazmente este carbono en formas que sean fácil y económicamente empleables sigue siendo un reto.

- 25 La producción de materias básicas químicas y combustibles de la biomasa vegetal está aún en pañales. Las materias primas basadas en almidón, por ejemplo, pueden aplicarse para la producción de productos químicos tangibles. El empobrecimiento de sustratos y la biodisponibilidad de cepas complican la bioconversión, junto con las cuestiones de seguridad, reales o percibidas, relacionadas con la contaminación, y una ausencia de viabilidad económica, han ralentizado particularmente el progreso en este área. La biomasa no celulósica, tal como el almidón de maíz, se comparara favorablemente con recursos fósiles desde el punto de vista de la masa, pero es demasiado costosa. En cambio, la biomasa celulósica, tal como álamo de corta rotación, pino, césped de pradera, forraje de maíz, bagazo de caña de azúcar, lodo de papel residual y residuos sólidos urbanos, es rentable tanto en cuanto a masa como a energía. Sin embargo, la biomasa celulósica, debido a su textura compleja, es difícil de procesar.
- 30 Actualmente, la biomasa celulósica requiere pretratamiento con ácidos fuertes, bases y/u otros productos químicos para su uso como un sustrato para combustible, por ejemplo, etanol o para la producción químicas, por ejemplo productos de papel. Este pretratamiento expone eficazmente subunidades poliméricas, principalmente hexosas, pentosas y compuestos fenólicos, que después se escinden y se usan como sustratos, pero es costoso. Una alternativa al uso de productos químicos más tóxicos es el uso de enzimas, aunque esto no es rentable.

- 40 La tecnología de ADN recombinante se ha aplicado para modificar microorganismos para realizar la bioconversión de sustratos a costes reducidos, ampliando de este modo el uso de microorganismos y aumentando el número de productos que se producen. Por ejemplo, se han construido células de plantas que expresan enzimas lignocelulósicas degradantes, aunque raramente se diferencian y se regeneran en plantas completas debido a la descomposición de componentes estructurales. En los casos en los que se diferencian en plantas completas, por ejemplo, con sustratos de lignina y celulosa, las actividades enzimáticas son bajas y las plantas requieren procesamiento adicional. Intentos para combinar el pretratamiento de la biomasa de sustratos con fermentación también han encontrado dificultades, en parte debido a las limitaciones de transferencia de masa y a la interferencia con el organismo fermentador.

- 50 Las SPIC o inteínas son péptidos de autoescisión en fase, que generalmente se producen como parte de una molécula de proteína precursora más grande. Las SPIC o inteínas difieren de otras proteasas o zimógenos en diversas formas fundamentales. A diferencia de las proteasas que se autoescinden u otras proteínas en polipéptidos múltiples, no ligados, las SPIC o inteínas tienen la capacidad tanto de escindirse como de ligarse bien en conformación cis o trans. Por tanto en vez de escisión terminal, que resultaría de la reacción de una proteasa en una proteína, las SPIC o inteínas tienen la capacidad de escindir en sitios múltiples y ligar los fragmentos de proteína resultantes. Esta escisión se induce en condiciones específicas y pueden modificarse por ingeniería genética usando técnicas de biología molecular. Las SPIC o inteínas se han descrito en la bibliografía en *Saccharomyces cerevisiae* (Kane *et al.*, Science 250: 651; Hirata *et al.*, J. Bio. Chem. 265: 6726 (1990)), *Mycobacterium tuberculosis* (Davis *et*

al., J. Bact. 173: 5663 (1991), Davis *et al.*, Cell 71: 1 (1992)), *Thermococcus litoralis* (Perler, *et al.*, PNAS 89: 5577 (1992)), y en otros microorganismos.

El documento WO 9/59091 se refiere a construcciones de expresión multigénica que contienen inteínas modificadas y a su uso para la introducción de genes múltiples en plantas usando un solo suceso de transformación. El corte y empalme de la inteína parece que se produce espontáneamente y no hay explicaciones de que pueda inducirse. Sun *et al.*, Protein trans-splicing to Produce Herbicide-Resistant Acetolactate Synthase, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67 (3), marzo 2001, p. 1025-1029 describen el corte y empalme de proteínas en trans usando la inteína DnaE (de *Synechocystis*) para producir acetolactato sintasa resistente a herbicidas funcional a partir de dos fragmentos génicos no enlazados en *E. coli*. Se dice que proporciona un modelo para el diseño de transgenes no transferidles en plantas. Sin embargo, no hay una explicación clara de que el corte y empalme de la inteína pueda producirse realmente en células o en tejidos de plantas. Wang *et al.*, Identification of an Unusual Intein in Chloroplast ClpP Protease of *Chlamydomonas eugametos*, Journal of Biological Chemistry, 2 de mayo 1997, Vol. 272, N° 18, p. 11869-11873 y el documento US 5496714 describen la aplicación de la tecnología de inteína y la producción de proteínas modificadas en organismos distintos de plantas.

Por consiguiente, existe una necesidad de mejorar nuevos métodos para la producción de energía y otros productos químicos o productos químicos o farmacéuticos a partir de fuentes más fácilmente renovables, tales como modificando plantas de tal manera que puedan usarse como materias primas energéticas y químicas.

Sumario

Según la presente invención, se proporciona una planta transgénica que se caracteriza porque presenta una construcción de expresión que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína modificada que comprende una proteína diana y una secuencia de inteína condensada internamente dentro de la proteína diana en una posición por la cual la presencia de la inteína inactiva la actividad de la proteína diana, en la que la proteína diana es una proteína de degradación lignocelulósica y la inteína tiene la capacidad de cortar y empalmar la proteína modificada en la conformación cis, y la inteína se selecciona del grupo que consiste en una inteína procedente de la polimerasa de *Pyrococcus* spp., la inteína de Psp pol, y la secuencia codificadora de la inteína de Psp pol puede amplificarse mediante una reacción de PCR empleando los cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, y la actividad de la proteína diana puede recuperarse tras la inducción del corte y empalme de la inteína.

Según la presente invención, también se proporciona un método para fabricar la planta transgénica, que comprende proporcionar la construcción de expresión; transformar una planta, o una de sus porciones, con la construcción de expresión; y regenerar la planta transgénica a partir de la planta, o una de sus porciones, transformada.

La presente invención proporciona plantas, sus partes, plántulas, semillas, plantones, y su descendencia (mencionado en su conjunto como "plantas") genéticamente recombinantes, que pueden contener secuencias génicas exógenas sencillas o múltiples, estando cada una interrumpida por, o fusionada a secuencias de Secuencias de Proteínas Intermedias Controlables (SPIC) o de inteína sencillas o múltiples, y opcionalmente secuencias reguladoras adecuadas para la expresión génica y la transformación de una planta. Las secuencias génicas modificadas pueden expresarse constitutiva o transitoriamente, a lo largo de toda la planta o en tejidos específicos, o cualquier combinación de la misma, que incluye secuencias génicas modificadas con SPIC o inteína tanto sencillas como múltiples. En diferentes realizaciones de la invención, cualquier secuencia génica modifica, o conjunto de secuencias génicas modificadas, puede expresarse en cualquiera o todos los tejidos constitutivamente o en momentos específicos.

La invención también se refiere a métodos para la producción de plantas transgénicas que comprenden genes modificados con SPIC o inteína, por ejemplo, construyendo primero un segmento de ADN que comprenda el gen parental modificado con SPIC o inteína, y transformar la planta con la construcción.

La invención también se refiere a métodos de producción de una proteína(s) modificada con SPIC o inteína en plantas transgénicas, por ejemplo, transformando la planta, o las células de la planta, con una secuencia(s) génica modificada sencilla o múltiple, y expresando la proteína(s) modificada con SPIC o inteína. En una realización preferida las secuencias génicas pueden expresarse en cualquier momento. En otra realización, antes de que la proteína(s) vayan a cortarse y empalmarse esta(s) se proporciona preferentemente con una actividad(es) y/o propiedad(es) estructural sustancialmente diferentes. El producto o los productos de la proteína de corte y empalme tienen sus actividades descubiertas, a menos que estén inhibidas por una molécula(s) análoga producida exógena o endógenamente en la secuencia parental de la proteína no modificada con SPIC o inteína. Los productos génicos modificados con SPIC o inteína pueden expresarse en grandes cantidades y recuperarse del material de la planta. Como alternativa, la planta o el material de la planta puede en sí mismo usarse como una fuente de productos génicos modificados con SPIC o inteína.

La invención también proporciona el uso de productos génicos modificados con SPIC o inteína expresados en plantas, el uso de plantas transgénicas que expresan genes modificados con SPIC o inteína en piensos para animales, o el uso de plantas transgénicas que expresan genes modificados con inteína en procesos industriales discontinuos, semicontinuos, y continuos para la producción de combustibles, productos químicos, alimento para

animales o aditivos alimenticios, productos farmacéuticos, papel, productos de papelería o para la descontaminación de materiales residuales.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán obvios para los expertos en la técnica a partir de la breve descripción de los dibujos y del análisis que se indica a continuación.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la construcción de una secuencia de ADN que codifica la proteína modificada con SPIC o inteína construyendo una secuencia codificante de ADN de la proteína modificada con SPIC o inteína construida por la fusión de una secuencia codificante de SPIC o de inteína con la secuencia codificante de una proteína de una actividad propuesta, bien en el extremo 3' del gen, en el extremo 5' del gen, o internamente, dentro del gen de la proteína. Otras variantes son posibles combinando cualquiera de las tres secuencias codificantes de la proteína modificada con SPIC o inteína resultantes mostradas en la Figura 1.

La Figura 2 ilustra una configuración de las proteínas modificadas con SPIC o inteína resultantes, o componentes de las mismas. Esta figura demuestra el caso de una sola proteína modificada con SPIC o inteína. Sin embargo, también pueden combinarse secuencias de proteínas nativas múltiples con SPIC o inteínas sencillas o múltiples.

La Figura 3 ilustra la escisión de una proteína modificada con SPIC o inteína, o componentes de la misma, que puede realizarse *in vivo* o *in vitro* cuando se somete a un estímulo(s) de escisión apropiado. En esta figura se ilustra esquemáticamente un ejemplo del proceso de escisión de una sola proteína modificada con SPIC o inteína. Pueden construirse otras variantes como combinaciones de las proteínas modificadas con SPIC o inteína mostradas en esta figura.

20 Descripción detallada de la realización(es) preferida

Esta invención surge de un deseo del inventor de proporcionar nuevos métodos para generar productos valiosos a partir de recursos renovables, por ejemplo, materiales de plantas o biomasa y hacerlo de manera rentable. Una manera de conseguir eficazmente este objetivo es modificando la biomasa vegetal a través del uso de proteínas modificadas con SPIC o inteína, en el que las SPIC o la inteína se unen a una proteína deseada. En el texto de esta patente las expresiones SPIC e inteína pretenden referirse a productos similares, y se utilizarán indistintamente. Partiendo del conocimiento de que las proteínas modificadas con inteína pueden expresarse en células a alta titulación, incluso con actividad sustancialmente disminuida, se llegó a la conclusión de que si se clonaban en una planta, esta disminución en la actividad permitiría que las células de la planta transgénica, fragmentos de la planta o tejidos de la planta, así formados, se desarrollasen en plantas completas productoras de proteínas modificadas con inteína. Además, pensó que dichas plantas transgénicas podían proporcionarse como diversas realizaciones diferentes, tales como aquellas en las que se producen plantas recombinantes para expresar las proteínas modificadas bien 1) de manera constitutiva o transitoria, 2) a través de inducción química o inducción biológica por el ciclo de crecimiento de la planta, 3) en toda la planta o específicamente en tejidos distintos de la planta y/o 4) con o sin localización subcelular, entre otras. Como contempla el inventor, en una realización de la invención, la proteína(s) modificada con inteína expresada comprende una secuencia(s) de la proteína parental, cuya actividad(es) puede conocerse, deducida a través de homología de secuencia o estructural y/o producirse por mutagénesis o por síntesis de novo; estando cada secuencia(s) parental interrumpida por, o fusionada con, una secuencia(s) de inteína o partes de la misma. Una vez insertada, la parte(s) de inteína de la proteína(s) modificada inactiva, *in vivo*, la actividad o utilidad estructural de la proteína parental. La actividad original de la proteína parental puede, no obstante, recuperarse sustancialmente, y cuando se desee, por inducción del corte y empalme de la inteína. Por ejemplo, en una aplicación, después de recoger la planta y durante el pretratamiento del sustrato, cada SPIC puede inducirse para su propio corte y empalme de su secuencia de proteína parental, cuya proteína parental ha recuperado ahora su actividad original. Los expertos en la materia conocen métodos para el corte y empalme de la inteína con, o sin, recombinación de la proteína para una actividad funcional, y no es necesario repetirlo en este documento. Estos métodos incluyen el uso de luz, temperatura, cambio de pH y/o la adición de reactivos químicos.

De modo más específico, la presente invención se dirige a una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendiente o descendiente, que comprende una construcción(s) expresión que codifica al menos una proteína modificada que comprende una proteína(s) diana o un segmento(s) de proteína que está condensado, en posición interna o terminal, con una secuencia(s) de proteína intermedia controlable (SPIC) o con una secuencia(s) de inteína, o sus segmentos, o con su amino terminal(es) o con su carboxilo terminal(es). En una realización, cada construcción de expresión de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendiente o descendiente comprende, unido operativamente entre sí, un primer segmento(s) de ácido nucleico que codifica una proteína(s) diana, y un segundo segmento(s) de ácido nucleico que codifica una secuencia(s) de SPIC o de inteína, y opcionalmente un marcador(es) de selección o gen(es) indicador y/o un promotor(es). Se entiende que en una realización más específica las secuencias pueden fusionarse, bien directamente o mediante un engarce(s), y más preferentemente en fase de lectura. La proteína(s) modificada puede expresarse por la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendiente o descendiente de manera constitutiva o inductiva. En el último caso, la expresión y/o corte y empalme de al menos una proteína(s) modificada puede

desencadenarse o inducirse por un estímulo(s). Ejemplos de estímulos adecuados comprenden un cambio de pH, un cambio de osmolaridad, o de temperatura, la adición de un fertilizante, pesticida o producto químico, o un cambio de luz y/o de sonido. La planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente puede expresar la proteína(s) modificada bien en un punto determinado del ciclo de la vida de la planta, en uno o más tejidos específicos o partes de los mismos, y/o en al menos un compartimento(s) subcelular específico. Como alternativa o junto con lo último, la proteína(s) modificada puede expresarse y secretarse extracelularmente. El tejido o tejidos específicos de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente pueden ser de semillas, raíces, frutos, tallos, tubérculos y/u hojas, y los compartimentos subcelulares específicos pueden ser un apoplasto celular, citosol, mitocondria, plastidio, retículo endoplásmico, cuerpo de inclusión, vacuola y/o núcleo. Sin embargo, también se incluyen otras variaciones dentro de los límites de la presente invención.

La planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente, también puede llevar un marcador de selección que le confiere resistencia a un producto químico. Son ejemplos de estos bromoxinil, ácido 2,2-dicloropropiónico, G418, glifosfato, haloxifop, higromicina, imidazolina, kanamicina, metotrexato, neomicina, fosfinotricina, setoxidimo, ácido 2,2-dicloropropiónico, glifosato, higromicina, trlcoteceno, sulfonilurea, s-triacina, y/o triazolopirimidina. Sin embargo también pueden emplearse otros. El promotor puede incluirse delante de un polinucleótido de proteína modificada con SPIC o inteína. En algunos casos, la planta, o parte de la planta, plántula tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente puede ser tolerante o resistente a normalmente niveles extremadamente tóxicos de un producto(s) químico seleccionado. En otra realización, la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente es fértil, y tiene al menos una secuencia(s) polinucleotídica que codifica la proteína modificada hereditaria. Sin embargo, del mismo modo puede que no sea fértil. Además, como se ha indicado anteriormente, también son parte de esta invención plantas endogámicas e híbridas genéticamente recombinantes, o partes de planta, plántulas, tejidos, células, fracciones subcelulares, semillas, plantones, protoplastos, descendencia o descendientes, producidos o no por el método de la presente invención. De particular interés son las partes de plantas, las semillas de plantas, las plántulas de plantas y los protoplastos de plantas, que tienen importancia comercial sustancial. También son de interés comercial o de otro tipo, las plantas, los tejidos de plantas, las células de plantas y las fracciones subcelulares. La proteína de corte y empalme puede tener la capacidad de cambiar el contenido o la actividad de un componente(s) de la planta. En un ejemplo, el contenido puede modificarse, por ejemplo, reducirse, de un componente de la planta, tal como glucosa, fructosa, celulosa, hemicelulosa, lignina, glicerol, glicina-betaína, pectina, sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa, aminoácidos, lípidos, vitaminas y/o almidón y similares. En otro, el componente de la planta cuya actividad se modifica, por ejemplo se reduce, puede ser uno o más de proteínas, ARN y/o lípidos, entre otros. En un aspecto, la secuencia de SPIC o de inteína y la proteína o segmento de proteína diana forman al menos una unión de corte y empalme con la proteína diana. En una realización deseable, el resto de aminoácido en el extremo(s) carboxilo de la unión, o uniones, de corte y empalme se proporciona con una cadena(s) lateral de hidroxilo o sulfhidrilo. En otra realización particularmente útil, la unión, o uniones, de corte y empalme se coloca aguas abajo de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la mismas, y puede comprender un resto(s) aminoácido que carecen, por ejemplo, de cadenas laterales hidroxilo o sulfhidrilo en el extremo(s) amino de la proteína diana o segmento(s) de proteína. En otra variación importante, la unión(es) de corte y empalme se coloca aguas arriba de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, y puede comprender un resto(s) aminoácido que tienen cadenas laterales de hidroxilo o sulfhidrilo en el extremo(s) amino y de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma. Otra posibilidad importante es en la que la unión(es) de corte y empalme se coloca aguas arriba de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, y esta puede comprender una cisteína. Aún otra variación importante es en la que la unión(es) de corte y empalme se coloca aguas abajo de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, y pueden proporcionarse con His-Asn en el extremo(s) carboxilo de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, y/o con un resto(s) aminoácido que tienen cadenas laterales de hidroxilo o sulfhidrilo en el extremo(s) amino de la región(es) contigua de la proteína(s) diana. En otra variante interesante más, la unión(es) de corte y empalme se coloca aguas abajo de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de proteína de la misma y puede proporcionarse con una Asp en el extremo(s) carboxilo de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, y/o con un resto(s) aminoácido que tiene cadenas laterales de hidroxilo o sulfhidrilo en el extremo(s) amino de la región(es) contigua de la proteína(s) diana o segmento(s) de proteína. Modificaciones adicionales son aquellas en las que la Asp en el extremo(s) carboxilo se reemplaza por un aminoácido(s) que carece de cadenas laterales carboxilo o amino, y en el que la secuencia(s) de SPIC o de inteína o su segmento(s) comprende una secuencia(s) de SPIC o de inteína externamente controlables o segmento(s) de las mismas, que pueden ser de, entre otras especies, un hongo de *Saccharomyces*, y más específicamente un hongo de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras construcciones adecuadas para la inserción en los productos de la invención son aquellas en las que la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma, están insertados inmediatamente antes de Ser, Thr o Cys de la proteína(s) diana o segmento(s) de proteína y en el que el extremo(s) amino o carboxilo de inteína comprende, entre otros, Ser, Thr o Cys. Como se describe con mayor detalle más adelante, la proteína diana puede expresarse en un microorganismo, tal como una bacteria, como se sabe en la técnica. Son ejemplos de microorganismos que pueden emplearse *Bacillus thuringiensis* o *Phytolacca insularis*. Una proteína diana preferida es la endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, que produce una endotoxina modificada de *Bacillus thuringiensis* que va a expresarse. Otra realización incluye la expresión de la proteína diana

de un virus. Aunque puede emplearse cualquier virus, son ejemplos el virus Y de la patata, geminivirus, aspermivirus 2b y el virus del mosaico del pepino, entre otros.

La planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente puede producirse mediante un método que comprende

- 5 proporcionar una construcción de expresión que codifica al menos una proteína modificada que comprende una proteína diana, o un segmento(s) de proteína, que está condensada, en posición interna o terminal, con una secuencia(s) SPIC o de inteína, o su segmento(s), o con su amino terminal(es) o con su carboxilo terminal(es);
- 10 transformar una planta, o una parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente con la construcción de expresión; y
- regenerar una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante transformado(a) a partir de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante transformado(a), que codifica al menos una secuencia de proteína modificada.
- 15 Se prefiere en gran medida que la transformación sea una transformación estable. Sin embargo, son también deseables transformaciones que tengan alguna estabilidad temporal. La etapa de regeneración puede realizarse cruzando una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante; cruzando una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante y una planta, cruzando
- 20 una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente no genéticamente recombinante; y/o retrocruzando dos plantas cruzando una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente genéticamente recombinantes. La construcción de expresión empleada en este método puede comprender uno o varios de un promotor, un marcador de selección, un marcador de resistencia, un marcador hereditario, una secuencia de poliadenilación, un represor, un potenciador, una secuencia de localización, y/o una secuencia de señalización. Se pretende que estos se usen en la aplicación de tecnologías recombinantes conocidas en la técnica, y como se ilustra en cualquier parte y más adelante en los ejemplos. En un aspecto importante del método, la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente se transforma, o transforman, con la construcción de expresión mediante
- 30 transformación viral, bombardeo con microproyectiles cubiertos de ADN, transformación génica liposomal, transferencia génica bacteriana, electroporación, o transformación génica química, o más de una de estos. Como se ha indicado anteriormente, la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente puede transformarse mediante una bacteria, por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens*, aunque también pueden emplearse otros microorganismos. En el presente método, la transformación puede realizarse por transformación génica química y puede realizarse utilizando, por ejemplo, fosfato de calcio y/o polietilenglicol u otros productos químicos conocidos en la técnica por ser adecuados para esta finalidad. La selección puede realizarse usando un marcador de selección, o un marcador de resistencia, o de la expresión de al menos un ácido nucleico que codifica una proteína modificada con SPIC o inteína. En el método de la invención, la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o
- 40 descendiente, genéticamente recombinante, puede regenerarse a partir de un tejido(s) embrionario transformado; de protoplastos de plantas; de células derivadas de embriones inmaduros; o de semillas transformadas, entre otras fuentes.
- En esta patente también se proporciona otro método y dicho método es adecuado para la producción de una proteína modificada, o un segmento(s) de proteína, procedente de una planta, o parte de la planta, plántula, tejido,
- 45 célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante transformada, que expresa dichas una proteína(s), o su segmento(s), que comprende realizar el método descrito anteriormente, y recolectar después la proteína(s) modificada, o su segmento(s), a partir de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente transformada. El método puede comprender también purificar la proteína modificada, lo cual puede realizarse mediante cualquiera de las muchas técnicas conocidas en la técnica. Tal como se describe en la presente, el método puede producir una proteína(s) modificada, o un segmento(s) de proteína, que comprende una proteína(s), o un segmento(s) de proteína o un segmento(s) de proteína, modificada con SPIC o inteína.
- 50 En la presente se proporciona otro método para producir una proteína modificada que comprende una proteína(s) diana, o un segmento(s) de proteína, condensada, en posición interna o terminal, con una secuencia(s) SPIC o de inteína, o su segmento(s), o con su amino terminal(es) o con su carboxilo terminal(es), comprendiendo dicho método:
- 55 obtener una construcción de expresión que codifica una proteína diana que tiene una secuencia(s), o su segmento(s), de SPIC o de inteína condensada dentro de marco, o su amino terminal(es) o su carboxilo terminal(es);

transformar una célula(s) de una planta hospedante con la construcción de expresión; y

cultivar la célula hospedante de la planta transformada bajo condiciones que son eficaces para expresar la proteína modificada.

5 En un aspecto preferido, en la construcción de expresión el al menos un primer segmento(s) de ácido nucleico que codifican la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma se fusionan con el extremo 5' del segundo segmento(s) de ácido nucleico que codifica la proteína(s) diana o segmento(s) de proteína. Como alternativa, en la construcción de expresión el primer segmento(s) de ácido nucleico que codifican la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma pueden fusionarse con el extremo 3' del segundo segmento(s) de ácido nucleico que codifica la proteína(s) diana o segmento(s) de proteína. Resulta particularmente adecuado practicar el presente método empleando una secuencia(s), o su fragmento(s), de SPIC o de inteína de *Saccharomyces*, que se sabe que realiza, en cis o en trans, la escisión, la ruptura, el acoplamiento, la escisión y acoplamiento, la ruptura y acoplamiento y/o la ciclación. Cuando la SPIC o la inteína o su segmento(s) se emplean para inducir el corte y empalme de la proteína, este suceso puede inducirse o desencadenarse mediante un cambio de temperatura, luz o pH, la adición/eliminación de un reactivo químico que facilite/inhiba el corte o la ruptura, la desfosforilación o la desglicosilación de aminoácido o, mediante el contacto con un péptido o peptidomimético, o su eliminación, la activación o el bloqueo del corte o la ruptura. Otra manera de inducir el corte de una proteína, *in vitro* o *in vivo*, es mediante el contacto con un agente de péptido o peptidomimético, o su eliminación, que puede activar o bloquear el corte o la escisión. Otras variaciones interesantes que pueden producir mejores resultados son en las que un terminal(es) amino o carboxilo de una secuencia(s), o su segmento(s), de SPIC o de inteína comprende Ser, Thr o Cys, o en las que un carboxilo terminal(es) de una secuencia(s), o su segmento(s), de SPIC o de inteína comprende Asp que precede a Ser, Thr o Cys de dicha una proteína(s) diana, o un segmento(s) de proteína. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.834.247, que describe, en los reinos procariota y eucariota, parte de la metodología incorporada en esta invención para la producción de plantas híbridas con características útiles. En el presente método, la construcción de expresión puede comprender adicionalmente un promotor, un marcador de selección, un marcador de resistencia, un marcador hereditario, una secuencia de poliadenilación, un represor, un potenciador, una secuencia de localización o una secuencia de señalización. Además, el método presentado en este documento también puede comprender la transformación de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, células, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente con la construcción de expresión que se está implementando por transformación viral, bombardeo con microproyectiles cubiertos de ADN, transferencia génica liposomal, transferencia génica bacteriana, electroporación y/o transformación génica química y/u otros métodos conocidos en la técnica o que se desarrollarán posteriormente. Como se describe anteriormente, en el método descrito en este documento, la bacteria utilizada para transferir la construcción de expresión puede ser una bacteria de *Agrobacterium tumefaciens*; el producto químico usado para la transformación puede ser fosfato de calcio, o polietilenglicol; las células de plantas, partes de plantas, plantas, etc. transformadas pueden seleccionarse a través de la expresión de un marcador de selección, o marcador de resistencia; la selección de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente transformado(a) puede realizarse a través de la expresión de la secuencia génica de proteína modificada; y la regeneración de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente genéticamente recombinante puede realizarse a partir de tejido embrionario transformado; a partir de células derivadas de embriones inmaduros; o a partir de semillas transformadas, entre otros.

En esta patente también se describe un método para producir semillas que expresan una proteína modificada, comprendiendo dicho método:

45 obtener la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente genéticamente recombinante de la invención;

cultivar la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente genéticamente recombinante; y

obtener de la planta cultivada las semillas que expresan una proteína(s) modificada.

50 Otro método proporcionado por esta patente es un método para emplear una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente que exprese una proteína para producir un compuesto, comprendiendo dicho método:

recolectar una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante de acuerdo con las explicaciones de esta patente;

55 procesar mecánicamente la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente;

combinar la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente mecánicamente procesado, con una planta genéticamente no recombinante en una proporción de recombinante: no recombinante mayor que o igual a cero; y

procesar químicamente la planta o partes específicas de la planta en condiciones eficaces para obtener el compuesto.

Este método puede llevarse a la práctica mediante procesamiento mecánico de la planta, o de parte de la planta, de la plántula, de tejido, de la célula, de la fracción subcelular, de la semilla, del plantón, del protoplasto, de la descendencia o descendiente, por extrusión, molienda, desmenuzado, trituración, troceado, separación, compresión, explosión y/o rasgado. Sin embargo también son adecuadas otras técnicas de procesamiento. El procesamiento químico de los componentes combinados puede realizarse mediante diversas técnicas o mediante una combinación de las mismas. Algunas de ellas son, tratamiento previo con vapor, ácido diluido concentrado, detonación con amoníaco, esterilización, inmersión en agua, mezcla con un disolvente, un cambio de pH, temperatura u osmolaridad, exposición a o a cambios de luz, catálisis enzimática y/o inorgánica, sacarificación, blanqueamiento, restregado, fermentación, destilación, cromatografía, adsorción y/o adición de un producto(s) químico. Por supuesto también se emplean otras técnicas satisfactoriamente. Se utilizan diversas etapas cuando se lleva a la práctica lo siguiente: el pretratamiento puede incluir la vaporización de los productos combinados con fines de esterilización; el procesamiento químico puede realizarse por pretratamiento con al menos uno de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido carbónico, o sumergiendo en agua a una temperatura mayor que o igual a aproximadamente 20 °C; y/o mezclando los productos combinados con al menos uno de agua, o un disolvente(s) orgánico o inorgánico. Como ya se ha explicado, puede aplicarse un estímulo(s) externo para inducir el corte y empalme de la proteína(s) modificada o segmento(s) de proteína. Son ejemplos de estímulos externos un cambio de pH, de osmolaridad o de temperatura, la exposición a sonidos, a la luz o la adición de un producto(s) químico. En algunos casos, la proteína(s) o el segmento(s) de proteína, de corte y empalme, pueden presentar una actividad(es) modificada con respecto a la proteína(s) o al segmento(s) de proteína modificado, tal como una actividad(es) catabólica o anabólica modificada con respecto a la proteína(s) diana original. Son ejemplos de proteína(s) o segmento(s) de proteína de corte y empalme aquellos que pueden degradar almidón, dextrina, pectina, lípidos, proteínas, quitina, lignina, celulosa o hemicelulosa o modificar lignina o que tienen actividad de sacarificación. Por tanto, la proteína de corte y empalme puede ser capaz de producir glucosa, fructosa, xilosa, fenol, glicerol, mañosa, ácido láctico, ácido acético, etileno, propileno, tolueno, etilbenceno, estireno, xileno, etilenglicol, butadieno, formaldehído, isopropanol, acetona, butanodiol, metanol, etanol, propanol, butanol, propanodiol, vitaminas, metano, etano, propano, butano, pentano, hexano, heptano, octano, benceno y/o biopolímeros, entre otros compuestos. En una realización específica del pretratamiento, la sacarificación y fermentación pueden realizarse en una etapa, y la fermentación puede realizarse empleando un microorganismo procaríota o eucariota capaz de producir ácido láctico, ácido acético, etileno, propileno, tolueno, etilbenceno, estireno, xileno, etilenglicol, butadieno, formaldehído, isopropanol, acetona, butanol, metanol, etanol, propanol, butanol, octanol, propanodiol, vitaminas, metano, etano, propano, butano, pentano, hexano, heptano, octano, benceno, proteína diana, proteínas terapéuticas, enzimas y/o biopolímeros, entre otros compuestos.

La invención también incluye la producción de materias primas de animales que comprenden una cantidad nutritiva de la planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente recombinante de la invención. Cuando la materia prima proporcionada por el inventor la ingiere un animal, la proteína(s) o segmento(s) de proteína, modificados se cortan y empalman mediante un estímulo(s) interno del animal. Son ejemplos de estímulos internos, entre otros, la saliva, la bilis, la quimotripsina, la tripsina, el bicarbonato, el ácido clorhídrico, o el pH del estómago o la temperatura del animal. La materia prima de la invención puede comprender una proteína(s) de corte y empalme tales como fitasas, endocelulasas, exocelulasas, amilasas, glucanasas, hemicelulasas, pectinasas, proteasas, xilanasas o lipasas, o una hormona del crecimiento. Sin embargo, según se desee, también pueden emplearse otras proteínas.

Otro aspecto de esta invención proporciona el uso de la materia prima descrita anteriormente para la fabricación de una composición potenciadora de la respuesta inmunológica, en el que dicha una proteína(s), o un segmento(s) de proteína, cortada comprende al menos un inmunógeno(s) recombinante. El inmunógeno puede incluir uno o más inmunógenos víricos o bacterianos, y puede formularse en diversas formas adecuadas. Se prefiere una formulación oral, una formulación transmucósica, una formulación absorbida en el tracto gastrointestinal (GI). Sin embargo, esta composición de materia puede formularse en cualquier forma sistémica o tópica adecuada para la administración a un animal, que incluye su adición a un alimento para animales.

Las materias primas de animales de la invención pueden producirse realizando en primer lugar las etapas indicadas anteriormente para obtener una planta, o parte de la planta, plántula, tejido, célula, fracción subcelular, semilla, plantón, protoplasto, descendencia o descendiente genéticamente recombinante y después procesar las plantas o una parte del producto resultante, genéticamente modificado, en condiciones eficaces para obtener una materia prima digerible para el animal.

El producto de esta invención también puede emplearse para promover el crecimiento del animal, por ejemplo produciendo materia prima que comprenda un producto que promueva el crecimiento y permitiendo que un animal acceda a la materia prima modificada. El producto de esta invención también puede emplearse para potenciar la respuesta inmunológica de un animal. Esto puede realizarse administrando a un animal que lo necesite una cantidad de potenciación inmunológica de la composición de la invención.

Un aspecto adicional de esta invención implica un método para la producción de una proteína(s) o de un segmento(s) de proteína diana, comprendiendo el método

5 producir una primera proteína(s) o segmento(s) de proteína, modificados, en el que el extremo amino de una secuencia(s) de SPIC o de inteína o un segmento(s) de la misma se fusiona con el extremo(s) carboxilo de una proteína(s) diana o un segmento(s) de proteína mediante el método descrito anteriormente;

producir una segunda proteína(s) modificada que comprende un segmento(s) de la secuencia(s) de SPIC o de inteína; y

10 poner en contacto la primera y segunda proteínas modificadas en condiciones eficaces para la escisión en trans de la secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de la misma con la segunda proteína(s) modificada.

Otra variación más del método anterior para la producción de una proteína(s) diana, comprende

producir una primera proteína(s) modificada, en las que el extremo carboxilo de una secuencia(s) de SPIC o de inteína o segmento(s) de proteína de la misma se fusiona con el extremo(s) amino de la proteína(s) diana o segmento(s) de proteína mediante el método ya descrito;

15 de manera similar producir una segunda proteína(s) modificada, o segmento(s) de proteína que comprende un segmento de la secuencia(s) de SPIC o de inteína; y

20 poner en contacto la primera y segunda proteínas modificadas en condiciones eficaces para la escisión en trans de la secuencia(s) de SPIC o de inteína, o segmento(s) de la misma con la primera proteína(s) modificada o segmento(s) de proteína. En este procedimiento la escisión puede inducirse por un cambio de temperatura, de luz o de pH, por la adición/eliminación de productos químicos que facilitan/inhiben el corte y empalme o bloquean la escisión, por la desfosforilación o la desglucosilación de aminoácidos y/o por la puesta en contacto con/eliminación de péptidos o peptidomiméticos que activan/bloquean la escisión/corte y empalme, entre otros.

25 Por tanto, la invención se refiere a plantas transgénicas, cuyo término pretende, en esta patente, ser sinónimo de plantas genéticamente recombinantes, sus semillas y plantas descendientes o cualquier parte de la planta, tejido o célula, que contenga un gen(es) para una proteína(s) modificada con SPIC o inteína. La invención también se refiere a métodos para la producción de las plantas transgénicas que producen proteínas modificadas con SPIC o inteína, a métodos para la producción en plantas de proteínas modificadas con SPIC o inteína y a usos de las plantas como sustratos para combustibles, productos químicos, pienso para animales o aditivos alimenticios, papel y producción de productos farmacéuticos. La invención permite la producción de plantas transgénicas que pueden usarse como una fuente de componentes estructurales o catalíticos, o que pueden tener sus proteínas modificadas con inteína purificadas y usarse por separado como proteínas estructurales o catalíticas. Las plantas transgénicas son plantas multicelulares que expresan genes exógenos sencillos o múltiples y sus actividades asociadas a proteínas (o ácido ribonucleico). Dentro del contexto de esta invención, puede hacerse referencia específicamente a clases de genes o enzimas, sin embargo, esto no es un aspecto limitante de la invención. Cuando se exponen clases específicas, se entiende que esto identifica cualquier gen o enzima dentro de la clasificación específica. Las SPIC o inteínas son secuencias de proteínas internas o adyacentes a una secuencia de proteína parental, que pueden escindirse a sí mismas espontáneamente en cualquiera, o en ambos extremos carboxilo o amino terminal y que pueden ligar selectivamente los fragmentos de proteína exteína resultantes cuando sea apropiado, en condiciones específicas. Véase, por ejemplo Perler, *et al.*, Nucl. Acids Res., 22: 1125-1127 (1994); Wallace, C. J., Protein Sci., 2: 697-705 (1993); Xu, *et al.*, Cell, 75: 1371- 1377 (1993); Pietrokovski, S., Protein Sci., 2: 697-705 (1994). Por tanto, puede decirse que las SPIC son péptidos de autoescisión en fase que generalmente se producen como parte de una molécula de proteína precursora más grande. Las SPIC o inteínas se diferencian de otras proteasas o zimógenos de diversos aspectos fundamentales. Al igual que las proteasas que se escinden a sí mismas o a otras proteínas en polipéptidos múltiples, no ligados, las inteínas tienen la capacidad tanto de escindir como de ligar en conformación cis o en trans. Por tanto, a diferencia de la escisión terminal que resultaría de la reacción de una proteasa sobre una proteína, la inteína tiene la capacidad de escindir en sitios múltiples, y ligar los fragmentos de proteína resultantes. Esta escisión se induce en condiciones específicas y puede realizarse implementando técnicas conocidas en biología molecular. Las inteínas de diversas fuentes, sus secuencias, características y funciones se han descrito ampliamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Kane *et al.*, Science 250: 651 (1990); Hirata *et al.*, J. Bio. Chem. 265: 6726 (1990) (*Saccharomyces cerevisiae*)] Davis *et al.*, J. Bact. 173: 5653 (1991), Davis *et al.*, Cell 71: 1 (1992) (*Mycobacterium tuberculosis*); Perler, *et al.*, PNAS 89: 5577 (1992) (*Thermococcus litoralis*). Como se muestra en la Figura 1, la combinación de una SPIC con una proteína de actividad o función estructural propuesta produce una proteína modificada con inteína, cuya actividad o función estructural propuesta puede modificarse sustancialmente. Las plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC (a partir de sus genes modificados con inteína asociados) son una mejora sobre las plantas transgénicas anteriores, debido a que la proteína modificada con inteína parental puede tener dos estados sustancialmente diferentes que actúan de mediadores de manera controlable mediante la escisión de la inteína. Esta escisión puede estar o no asociada con la recombinación de la secuencia de proteína propuesta. La invención puede realizarse con cualquier especie de planta, o combinarse con

cualquier combinación de proteínas y SPIC múltiples y sencillas. Las especies de plantas pueden incluir, pero sin limitación: álamo, abedul, cedro, pino, angiospermas, gimnospermas, semillas de soja, pasto, almidón, tabaco, alfalfa, caña de azúcar, coliflor, achicoria, banana, manzanas, cerezas, arándanos, pepino, lechuga, uva, limones; melones, nueces, mandarinas, arroz, naranjas, melocotones, peras, moras, fresas, tomates, zanahorias, coles, patatas, endivias, puerros, espinacas, maleza, arrurruz, remolacha, zanahoria, yuca, nabo, boniato, rábano, batata, trigo, cebada, soja, judías, colza, mijo, girasol, avena, guisantes, tubérculos, bambú, clorofíceas, algas o cualquier otra especie de planta. Las proteínas pueden incluir cualquier proteína conocida, putativa, modificada o creada *de novo*. Aunque la selección de la proteína nativa no está limitada, las proteínas preferidas incluyen proteínas lignocelulósicas degradantes (celulosas, lignasas), enzimas degradantes de almidón (amilasas, glucanasas), enzimas en las rutas biosintéticas necesarias para la producción de combustible o productos químicos, antígenos bacterianos o virales, enzimas en las rutas biosintéticas para vitaminas u otros aditivos alimenticios (fitasas, celulasas, amilasas, glucanasas, hemicelulosa, pectinasa, proteasa, xilanasas, lipasa, hormona del crecimiento), proteínas que confieren resistencia a plagas o a insectos, proteínas que confieren resistencia a herbicidas y proteínas terapéuticas (por ejemplo, hormona del crecimiento) implicadas en la patogénesis de enfermedades. La elección de la SPIC o la inteína utilizada para modificar la proteína, cuya fusión se expresa en la planta deseada, tampoco está limitada. Puede utilizarse cualquier SPIC o inteína sencilla o múltiple en cualquier configuración con respecto a la proteína o proteínas deseadas. Las SPIC o inteínas deben tener la capacidad de poder ser cortadas en uno o ambos extremos en respuesta a algunos estímulos, y pueden o no permitir el acoplamiento de las proteínas con las cuales se condensan las SPIC o inteínas sencillas o múltiples.

Combinando métodos conocidos en la técnica (Ausubel, *et al.*) pueden obtenerse plantas transgénicas que expresen proteínas modificadas con SPIC o inteína, y pueden producirse proteínas modificadas con SPIC o inteína en plantas transgénicas. Generalmente, estos métodos incluyen la construcción de un ADN que contiene la proteína modificada con SPIC o inteína de interés y los elementos reguladores necesarios requeridos para su expresión, amplificación y selección del ADN construido, transformación de la especie de planta deseada, regeneración y selección de las especies de plantas apropiadamente transformadas y, si fuera necesario, la purificación de la proteína modificada con SPIC o inteína en su forma nativa o escindida. Tanto la producción de las plantas transgénicas que expresan las proteínas modificadas con SPIC o inteína como la producción de proteínas modificadas con SPIC o inteína en plantas transgénicas forman parte de esta invención. Para la producción de las plantas transgénicas; o proteínas modificadas con SPIC o inteína en plantas transgénicas, debe construirse la SPIC o la secuencia de ADN de la proteína modificada con inteína. Esto se realiza fácilmente clonando en *E. coli*, o en cualquier otro hospedador adecuado (por ejemplo, la levadura puede ser beneficiosa en algunos casos, o la expresión en células de mamífero o de plantas con o sin el uso de vectores virales o no virales), la secuencia génica de la actividad deseada y la secuencia de inteína deseada. Una vez que el gen y las secuencias codificantes de inteína se han clonado, estas deben unirse en la configuración deseada. La secuencia de inteína seleccionada debe poder realizar las funciones deseadas, tales como corte y empalme en respuesta a un estímulo impuesto (por ejemplo, luz, cambio de pH, temperatura, presión o cambios en la composición química local que rodea a la proteína modificada de inteína), y si fuera necesario permitir el ligamiento de la proteína fusionada. Como se muestra en la Figura 1, la unión de la SPIC o de la secuencia de ADN de inteína y la secuencia de ADN de la proteína se realiza fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica, dando como resultado la SPIC o las secuencias codificantes de ADN de la proteína modificada con inteína, o combinaciones de las mismas. Como ya se ha indicado, una SPIC o una proteína modificada con inteína es una que fusiona la SPIC o la inteína con uno de cualquiera de los extremos carboxilo, amino, o partes internas de la proteína (s) nativa. Aunque existen muchos métodos alternativos, una forma de crear la fusión entre la SPIC o la inteína y las secuencias codificantes de la proteína deseada sería purificar el ADN que codifica la secuencia de proteína deseada, usando una enzima de restricción que corte la secuencia codificante de la proteína en el punto de inserción de inteína deseado y después ligar la secuencia codificante de inteína en el sitio de restricción. El polinucleótido, o cualquiera de los segmentos del ácido nucleico, pueden clonarse directamente con secuencias reguladoras y/o de selección apropiadas, o a través de un vector. Son ejemplos de segmentos reguladores promotores que controlan la expresión temporal de la SPIC o la proteína modificada con inteína, orígenes de replicación y/o secuencias de señalización que controlan la distribución espacial de las proteínas modificadas con SPIC o inteína *in vivo* en tejidos y/o compartimentos subcelulares específicos de la planta y son ejemplos de elementos de selección genes herbicidas o antibacterianos, marcadores fluorescentes, marcadores colorantes y otros marcadores selectivos adecuados. El polinucleótido o vector resultante que comprende la SPIC o la proteína(s) modificada con inteína que codifican el polinucleótido, o polinucleótidos, y opcionalmente cualquiera de los elementos de selección y reguladores deseados, pueden amplificarse después para obtener grandes cantidades de producto, que puede usarse para la transformación posterior de una especie de planta deseada. La modificación de cualquiera y de todas estas etapas es posible para facilitar la orientación y la fusión específica entre cualquiera de la SPIC o inteína, o inteínas, y proteína(s) deseada y se realiza empleando métodos conocidos en la materia. La modificación de cualquiera de las secuencias codificantes y/o la SPIC o secuencia codificante de inteína y el ligamiento de cualquiera o de ambas de estas secuencias puede también realizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida, mutagénesis al azar, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR propensa a errores y/o cualquier otro método adecuado que podría considerar rutinario un experto en la materia. Estas técnicas facilitan la colocación de diversas secuencias de unión, y puede usarse cualquier combinación que se desee o que sea adecuada. Del mismo modo, también puede implementarse cualquier combinación u orientación de elementos reguladores y selectivos de acuerdo con esta invención. Elementos reguladores de genes, tales como promotores (Guilley *et al.*, Higgins, T. J. V., Coruzzi *et al.*, Tingey *et al.*, Ryan *et*

al., Rocha-Sosa *et al.*, Wenzler *et al.*, Bird *et al.*), potenciadores (Brederode, *et al.*), sitios de corte y empalme de ARN, sitios de unión ribosomal, sitios de glucosilación, sitios de corte y empalme de proteínas, secuencias de señalización subcelular (Smeekens *et al.*, van den Broeck *et al.*, Schreier *et al.*, Tague *et al.*), secuencias señal secretoras (Von Heijne, G., Sijmons, *et al.*) u otros pueden ser ventajosos en el control de la distribución temporal o espacial de la concentración de la SPIC o de la proteína modificada con inteína y de la actividad *in vivo* de la planta transformada. Puede desearse el uso de estos elementos para facilitar la producción y procesamiento de las proteínas modificadas con inteína en plantas transgénicas. La expresión de la proteína(s) modificada con inteína puede realizarse de manera constitutiva o inducida. Para realizar cualquiera de estos modos, puede implementarse cualquiera de los métodos bien descritos en esta patente o conocidos en la materia, o posteriores que estén disponibles. La inducción de la expresión de proteínas puede realizarse con un estímulo(s) externo. Son ejemplos de estos, la exposición a un pesticida(s), a la luz, a un cambio(s) de temperatura y/o sonido. Sin embargo, también pueden emplearse otros estímulos externos. Además, la planta recombinante también puede expresar cualquiera de uno o varios de los genes marcadores de selección o genes indicadores mencionado anteriormente.

Después, una vez que se ha construido la SPIC, o las secuencias de ADN de la proteína modificada con inteína, que se ha combinado con las secuencias de ADN reguladoras y de selección deseadas, que se ha clonado y seleccionado de manera satisfactoria, se requiere la transformación de la especie de planta deseada y la generación de plantas completas. Para la transformación de una especie de planta deseada, y para la generación de plantas completas, pueden realizarse métodos mediante técnicas conocidas en la materia (Draper, *et al.*, Potrykus, *et al.*). Las técnicas de transformación incluyen, sin limitación: transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, transferencia génica mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, transferencia génica directa a protoplastos de las plantas, transferencia génica mediada por el plásmido TI (con o sin un plásmido auxiliar), biolística o transformación de plantas con bombardeo de partículas (Gordon-Kamm *et al.*), microinyección y transformación mediada con fibras, y electroporación tisular (Shimamoto *et al.*). La transferencia génica puede producirse en plantas completas, en explantes de la planta (tales como, pero sin limitación, explantes radiculares), en cualquier parte de la planta (tal como, pero sin limitación, en segmentos foliares, semillas o segmentos de semillas de la planta), en los protoplastos o apoplastos de la planta, o en células sencillas o múltiples de la planta. Cada método diferente se ha descrito sustancialmente con detalle en la técnica anterior. En la técnica se conocen métodos de selección de plantas transformadas adecuadamente. Pueden facilitarse métodos de selección incluyendo un marcador de selección en el ADN transformado que contiene la SPIC o la proteína modificada con inteína (tal como un gen de resistencia, un gen que codifica la producción de un compuesto con color, un gen que codifica la producción de un compuesto fluorescente o cualquier otro método adecuado). Adicionalmente, para confirmar la presencia de la SPIC o de la secuencia codificante de la proteína modificada con inteína deseada, el ADN de las plantas transformadas puede aislarse y secuenciarse. También son adecuadas otras técnicas para la confirmación de los procesos de selección, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, el análisis de digestión con enzimas de restricción y el análisis de Southern. Puede usarse cualquier método de selección que permita la identificación de la planta transgénica deseada. Una vez que la planta se transforma con la proteína modificada con SPIC o inteína y con las secuencias reguladoras y de selección deseadas, las plantas completas pueden regenerarse mediante métodos conocidos en la materia (Horsch *et al.*). La mayoría de los métodos consisten en cultivarlas células, los explantes, los tejidos de la planta, o las plantas completas transformadas en el medio apropiado y en condiciones de luz y temperatura apropiadas. El método usado para regenerar la planta no debe limitar la invención y puede usarse cualquier método eficaz. La planta transgénica resultante debería producir proteínas modificadas con SPIC o inteína como se describe sustancialmente, o una combinación de, las mostradas esquemáticamente en la Figura 2. Una vez que se ha seleccionado la planta transgénica completa, la expresión de la proteína modificada con SPIC o inteína puede controlarse. Para la producción de plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína no es preciso pero es prudente confirmar que se ha obtenido la planta transgénica deseada que expresa la proteína modificada con inteína deseada y la expresión se controla adecuadamente a través de los elementos de control utilizados. El control de la expresión de la proteína modificada con SPIC o inteína es necesario para la purificación de las proteínas modificadas con SPIC o inteína en el estado escindido o no escindido, como se describe esquemáticamente en la Figura 3 para cualquier proteína modificada con inteína completa o componentes de proteínas modificadas con inteína que se componen de combinaciones de elementos mostrados en la Figura 3. La expresión de la proteína de la proteína modificada con inteína puede controlarse mediante análisis de Western, electroforesis (y tensión) en gel bidimensional o espectrometría de masas, realizada en extractos de plantas o en fracciones de proteínas purificadas de la planta transgénica. Además, algunas de las proteínas purificadas, o la propia planta transgénica, debe exponerse al estímulo de escisión de inteína. Después de la exposición, tanto la proteína modificada con inteína como la proteína resultante que aparece como consecuencia de la escisión de inteína pueden analizarse por análisis de Western u otros ensayos, para verificar la presencia de las proteínas apropiadas y la diferencia en la actividad entre la proteína modificada con inteína y la proteína escindida resultante. Deben diseñarse ensayos de actividad para controlar la actividad de la proteína deseada y deben ser específicos para esa actividad y no vulnerables a interferencias competitivas. Como patrón puede usarse un control para comparar la actividad nativa con la actividad modificada por la inteína y la actividad después de la escisión de la inteína. Los métodos y procesos que usan plantas transgénicas que expresan proteínas modificadas con SPIC o inteína incluyen el uso de las plantas como sustratos para la producción de combustible (incluyendo, pero sin limitación: la producción de biomasa inflamable, etanol, metanol, propanol, propano, metano u octano), el uso de las plantas como sustratos para la producción de productos químicos tangibles (incluyendo, pero sin limitación: ácido láctico, etanol, glucosa u otras hexosas, pentosas, propanodiol, eteno, etano, etileno,

compuestos fenólicos, aminoácidos, pasta de papel, pesticidas, insecticidas, otros alcoholes, otros éteres, otros ásteres), el uso de las plantas como sustratos para la producción de alimentos y o la producción de aditivos alimenticios (incluyendo pero sin limitación: aminoácidos, azúcares, vitaminas, fibra, o pienso para ganado), el uso de las plantas para la administración de vacunas, el uso de las plantas para la producción de proteínas terapéuticas (por ejemplo, hormona de crecimiento), el uso de las plantas para la producción de papel, el uso de las plantas para la descontaminación de materiales residuales. Se reivindica cualquier proceso discontinuo, semicontinuo o continuo, en el que como sustrato se usen las plantas transgénicas que expresan las proteínas modificadas con inteína para uno de los fines descritos anteriormente. Estos procesos pueden incluir, pero sin limitar su alcance, procesos en los que las plantas transgénicas que expresan las proteínas modificadas con inteínas se recogen, se exponen a los estímulos de escisión de inteína, se mezclan con otros sustratos en una proporción de planta transgénica con respecto a sustrato mayor que o igual a cero, y después se transforman química, enzimática o biológicamente en uno de los productos detallados anteriormente.

Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran los procesos de la invención, así como la elaboración de plantas transgénicas que expresan enzimas celulasas modificadas con SPIC o inteína y las plantas producidas de esta manera. En estas plantas, las enzimas celulasas se expresan como dictaminan los segmentos reguladores que controlan los genes modificados con SPIC o inteína. La actividad celulasa se reduce sustancialmente *in vivo* por interrupción de la enzima celulasa nativa por la inteína fusionada. Esto permite que la planta crezca, no inhibida o con poca inhibición, por la actividad celulasa. Las plantas pueden recogerse y exponerse a los estímulos de escisión de inteína, tales como la exposición a cierta longitud de onda, mezcla con un producto químico sulfuroso o que altere el pH, mezcla con una sal, mezcla con una sal, mezcla con cualquier otro producto químico o someter a un cambio de temperatura. En este caso, la inteína se escinde y la actividad celulasa se recupera, lo que después cataliza la escisión de celulosa y/o lignina. En este punto la combinación planta-proteína escindida puede mezclarse en cualquier proporción, preferentemente mayor que o igual a cero, con otros sustratos de plantas, sustratos químicos, basura urbana, subproductos de fabricación, enzimas y/o células procariotas o eucariotas, entre otros, para ayudar a realizar la conversión del sustrato de la planta en el producto deseado, por ejemplo, un combustible, un producto químico tangible, un alimento de consumo humano o animal, un aditivo alimentario, pasta de papel, o antígenos de vacunas, entre otros. También debe observarse que el uso de la presente invención no está limitado a procesos de fabricación o a procesos mecánicos. Los ejemplos no limitantes de aplicaciones de esta invención son en la administración de vacunas, hormonas o proteínas terapéuticas, en cuyo caso la proteína modificada con inteína puede comprender una combinación de una proteína(s) terapéutica y/o un antígeno(s) de proteínas terapéuticas, secuencias de proteínas potencialmente protectoras, y las SPIC o inteínas que pueden ser expresadas por la planta transgénica, por ejemplo, una planta de banana. El proceso de administración puede producirse, por ejemplo, mediante la ingestión de la planta por un ser humano o un animal no humano. La planta después se mastica en la boca y se expone a un estímulo(s) *in vivo* en el estómago que, a su vez, activa o induce la ruptura por la SPIC o inteína. En el caso de los seres humanos, el estímulo puede ser el pH reducido del estómago, que induce la ruptura de la SPIC o la inteína presente en el antígeno o proteína terapéutica, y proporciona el acoplamiento apropiado, si es necesario. El antígeno o la proteína terapéutica entonces fluyen hacia el duodeno o intestino delgado, en donde el pH será neutralizado y los productos de proteína pueden entonces absorberse con facilidad hacia la corriente sanguínea.

Antecedentes de información ejemplar proporcionada más adelante

Como sabrá un especialista, para la realización práctica de la presente invención, son adecuadas muchas variaciones diferentes en el protocolo presentado en el Ejemplo 1 a continuación. En general, se construye una secuencia de ADN que codifica una proteína modificada con SPIC o inteína y se integra en un vector apropiado, el material de la planta, ya sea en su cultivo de células sencillo en suspensión, protoplastos, segmentos o partes de plantas, plantas completas u otras formas adecuadamente descritas en el presente documento, se transforman con el vector, y se regeneran plantas completas, semillas, u otras formas de la planta descritas en el presente documento. El Ejemplo 1 muestra una realización del método de la invención, cuyas variaciones son posibles que pueden usarse para generar un árbol transgénico, por ejemplo, una especie de álamo que exprese una celulasa modificada con inteína. Sin embargo, la elección de la proteína deseada, depende de la aplicación que se desee de la especie de planta transgénica. En este sentido, pueden usarse proteínas nativas, proteínas sintéticas de novo o proteínas constituidas, por ejemplo, por transposición génica, por PCR propensa a error o por cualquier otro método análogo. Las celulasas catalizan una reacción de escisión degradando celulosa, un componente químico de la planta. Aunque se han construido otras plantas que expresan celulasas, las enzimas típicamente tienen que expresarse de manera transitoria, o incluirse en partes de la célula de manera que no alteren la diferenciación ni el desarrollo del tejido de la planta. Véase, por ejemplo Ziegler *et al.* (2000); Dai *et al.* (a), (2000); Dai *et al.* (b) (2000); Montalvo-Rodríguez *et al.* (2000). Por tanto, en el caso en el que la actividad celulasa no esté controlada por la localización o expresión transitoria, las plantas completas a menudo son difíciles de regenerar, o la actividad celulasa es a menudo demasiado baja para ser útil. Utilizando una celulasa modificada con inteína, la planta completa puede regenerarse al mismo tiempo que se produce la celulasa modificada con inteína menos activa en toda la planta y a una alta titulación. Véase, Aspergen *et al.*, Molecular Breeding 1: 91-99 (1995). Después, las enzimas pueden activarse por la capacidad de auto corte y empalme de la inteína para producir una celulasa de actividad aumentada con respecto a la celulasa modificada con inteína. Resulta notable que cualquier proteína nativa cumple con los requisitos de esta invención, y la selección de la proteína depende del uso previsto de la

planta. En este caso, una especie de álamo que puede ser inducida para que despolimerice su propia celulosa sería beneficiosa para la producción de etanol a partir de biomasa, o como un sustrato para la fermentación de otros productos químicos.

Construcción de proteínas modificadas con SPIC o inteína

- 5 Para construir el vector que lleva el ADN que codifica la proteína modificada pueden utilizarse diversas técnicas de ADN recombinante en combinación. Una de las más sencillas y directas utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ensamblar la secuencia de ácido nucleico, que codifica la proteína modificada con inteína, con extremos complementarios apropiados que facilita el ligamiento en el vector deseado. El método de la PCR se ilustra en el presente documento. Pueden utilizarse otros métodos para obtener el mismo objetivo, y algunos se
- 10 basan en la restricción y ligamiento específicos de la proteína deseada y secuencias que codifican la inteína, pero aún pueden incluir etapas de PCR. Se dispone fácilmente de kits de PCR para realizar la reacción (Epicentre, Madison, WI). El único requisito en cuanto a los cebadores es que uno debe emparejarse con el extremo 5' de la cadena sentido a amplificar, y el otro debe emparejarse con el extremo 5' de la cadena antisentido correspondiente; es beneficioso tener exclusividad de secuencia relativa.

Limpieza y purificación de un gel

La purificación de ADN de un gel puede realizarse usando electroelución, extracción con fenol, digestión con agarasa, extracción con perlas de vidrio, o a partir de diversos kits disponibles en el comercio. El Kit de Extracción en Gel QIAquick disponible en el comercio (Qiagen, Valencia, CA) y método asociado es un ejemplo.

Selección de inteína de acuerdo con el uso deseado

- 20 En esta etapa son importantes dos características: la propiedad que posee la SPIC o la inteína para inducir el corte y empalme que facilitará la optimización de la planta transgénica para su propósito deseado y donde colocar la inteína dentro de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína diana. Cualquier secuencia codificadora para una proteína de autocorte, es decir, una inteína, puede emplearse en esta invención. Se ofrece una compilación de algunas inteínas conocidas en el siguiente sitio web: <http://blocks.fhcrc.org/~pietro/inteins/>. Aún deben descubrirse
- 25 otras inteínas y pueden crearse nuevas inteínas mediante análisis de secuencias, métodos de ADN recombinante, y mutación de secuencias conocidas. Esta inteína del Ejemplo 1 es ventajosa para la especie de álamo transgénica deseada porque después del corte y empalme se produce una proteína nativa, predominantemente ligada (>75%) y es sensible a la temperatura de tal manera que el corte y empalme de la inteína se inhibe a temperaturas menores de 30 °C, y no es sustancial hasta 50 °C, temperatura a la cual la semivida de la proteína no escindida es menor de
- 30 2 horas.

Construcción de la proteína modificada con inteína

- Para garantizar el corte y empalme correcto de la inteína, en el Ejemplo 1, la inteína se inserta en fase cerca de un resto de serina, cisterna o treonina de la proteína diana nativa. Esto deja a la serina, cisteína o treonina de la proteína diana nativa en el lado del ácido carboxílico, de los restos conservados histidina-asparagina de esta inteína,
- 35 en las posiciones de aminoácidos 536 y 537 terminales de la inteína, respectivamente.

- Dependiendo del estímulo deseado y del mecanismo para el corte y empalme de la inteína, pueden usarse otros restos terminales. Si se desea, para facilitar estas necesidades, los codones pueden modificarse en el punto de unión de exteína-inteína. Se recomienda tener cuidado al modificar los codones en el punto de unión, ya que, según se desee, la proteína modificada con inteína puede escindirse, y permitir que los productos resultantes realicen la
- 40 actividad deseada. La posición de la inteína dentro de la proteína diana nativa es tal que cambia sustancialmente la actividad de la proteína modificada con inteína resultante. En la mayoría de las circunstancias prácticamente cualquier interrupción dentro o cerca del sitio activo de la molécula cumple este criterio. La combinación de la secuencia de inteína amplificada y la secuencia de proteína nativa amplificada se realiza fácilmente si un resto de serina se encuentra cerca de un sitio de restricción único de la secuencia codificante de la proteína nativa. Por el
- 45 contrario, la secuencia codificante de inteína se incorpora fácilmente en cualquier posición deseada en la secuencia de proteína nativa usando diversas reacciones en cadena de la polimerasa. En el presente documento se expone un método de PCR preferido. Preferentemente, se usan cebadores de 50 oligonucleótidos. Pueden usarse cebadores más cortos, sin embargo, es beneficioso, aunque no necesario, usar cebadores de la misma longitud. El cebador en sentido de la C-exteína puede hibridarse tanto con C-exteína como con la secuencia de inteína en el punto de unión
- 50 para facilitar la fusión de las secuencias amplificadas en amplificaciones por PCR posteriores. Para la amplificación de la inteína, ambos cebadores se solapan preferentemente con sus respectivas secuencias de exteína adyacentes deseadas para facilitar la fusión de la secuencia de inteína y las secuencias de exteína en amplificaciones por PCR posteriores. La reacción en cadena de polimerasa se realiza preferentemente usando el protocolo convencional indicado anteriormente, pero puede haber alguna optimización. Los parámetros de optimización típicos son la
- 55 cantidad de ADN molde y cebador añadida a la mezcla (generalmente, el ADN cebador se añade en gran exceso con respecto al ADN molde), las temperaturas y los tiempos de los ciclos de reacción, el número de ciclos y la concentración de $MgCl_2$. La longitud y composición de los cebadores usados también puede variar para producir una proteína modificada con inteína eficaz, siempre que se observen las restricciones de colocación. En el comercio se

dispone de kits que incluyen todos los reactivos necesarios: Taq ADN polimerasa, $MgCl_2$, mezcla de dNTP 25 mM (que contiene cantidades equimolares de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), tampón de reacción y agua.

En este punto, la siguiente ronda de PCR se inicia para fusionar las secuencias de exteína e inteína. En este caso, el fragmento de inteína se mezcla preferentemente con una parte equimolar del fragmento de celulasa C-exteína. La combinación de estos fragmentos representa tanto el molde como los cebadores (regiones solapantes) a usar. La adición del tampón de reacción, de los dNTP 25 mM, del $MgCl_2$ y de la Taq ADN polimerasa se requiere aún, al igual que el cambio de los ciclos de temperatura. Esta reacción se aumenta preferentemente mediante la adición de los siguientes cebadores en sentido y antisentido, respectivamente, junto con la ADN ligasa de *E. coli* (New England Biolabs, Beverly, MA), sin embargo, esta adición no es necesaria y dependiendo de las condiciones de reacción exactas empleadas puede no conducir a un aumento en la producción.

5'-ACAGAATGGGGAACGAGCGATGCTAGCATTTTACCGGAAGAATGGGTTC-3' [SEQ ID NO: 1]

5'-CGTGTCTGCTCCGTTTACCGCTTTTTTTAATTGGACGAATTTGTGCGTGA-3' [SEQ ID NO: 2]

Una vez completado, los productos de PCR se procesan preferentemente de nuevo sobre un gel de agarosa y la banda apropiada, de 2665 nucleótidos de longitud, se purifica del gel y se analiza de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Una pequeña cantidad del producto de reacción purificado se usa preferentemente para la cuantificación midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm en un espectrómetro de UV. Para completar el ensamblaje, se realiza una reacción PCR de la secuencia codificante de la celulasa modificada con inteína combinando cantidades equimolares de la C-exteína fusionada y fragmentos de inteína verdaderamente contruidos, con el fragmento de N-exteína previamente purificado. La reacción PCR se realiza preferentemente usando los mismos ciclos de temperatura que en la reacción anterior después de la adición del tampón de reacción, los dNTP 25 mM, el $MgCl_2$, y la Taq ADN polimerasa. Esta reacción se aumenta preferentemente mediante la adición de los siguientes cebadores en sentido y antisentido, y la ADN ligasa de *E. coli* (New England Biolabs, Beverly, MA); sin embargo esta adición no es necesaria y dependiendo de las condiciones de reacción exactas empleadas puede no conducirá un aumento de la producción.

5'-AGCATTCAGACCTCCCATTTCATACGAAAAGAGGAAATAGATAGATTTTC-3' [SEQ ID NO: 3]

5'-CGTGTCTGCTCCGTTTACCGCTTTTTTTAATTGGACGAATTTGTGCGTGA-3' [SEQ ID NO: 4]

Construcción del vector

Pueden incluirse otros elementos en el casete de expresión preparado en el Ejemplo 1, por ejemplo, secuencias de señalización de secreción extracelular, secuencias de señalización de localización intracelular otros promotores inducibles, etc. Dado que el vector está ahora incluido dentro de la cepa recombinante de *A. tumefaciens*, la transferencia génica a la planta de álamo depende del sistema de administración especializado de la bacteria. Otros métodos de transferencia génica se encuentran disponibles y la selección de un método de transformación adecuado depende de la fuente del material vegetal. Por ejemplo, pueden transformarse protoplastos o células de plantas individuales directamente con el plásmido pTiBo542 recombinante usando electroporación, cloruro de calcio, o biolística con bombardeo de partículas (Bio-Rad, Hércules, CA). Por el contrario, como material de partida, pueden usarse callos de plantas, segmentos de plantas, o en algunos casos, plantas completas, cuando sea apropiado. Preferentemente, para que se produzca una transferencia génica eficaz, se optimiza el tiempo de incubación y la densidad celular del cultivo.

Ventajas y usos del álamo transgénico del Ejemplo 1

La especie de álamo transgénico resultante puede cultivarse y realizar pases indefinidamente produciendo al mismo tiempo la celulasa modificada con inteína a una alta titulación. La celulasa puede activarse posteriormente recogiendo la planta, troceándola o moliéndola mecánicamente para aumentar el área de superficie expuesta y después incubar la masa resultante en una tina o en un tanque a una temperatura elevada (preferentemente de 30 °C a 50 °C) y/o a un pH inferior (6,5 o menor). Si se usa la exposición a la temperatura elevada, y la reducción del pH, se inducirá el corte y empalme de la inteína y se producirá la celulasa nativa a una actividad sustancialmente aumentada. En estas condiciones, la celulasa puede ahora catalizar la reacción de escisión de la celulosa para producir económicamente sustratos que puedan fermentarse posteriormente en etanol u en otras entidades químicas. Además, después del corte y empalme, esta planta puede usarse como una fuente de la celulasa modificada con inteína, o la celulasa nativa recuperada. En cualquier caso, la proteína se purifica preferentemente de la planta usando métodos bien conocidos en la técnica anterior, tales como precipitación, filtración con membrana, cromatografía, incluyendo cromatografía de afinidad, extracción, etc.

El uso de plantas transgénicas productoras de proteínas modificadas con inteína tiene dos ventajas sobre las plantas transgénicas indicadas anteriormente. Dado que la proteína modificada con inteína tiene sustancialmente menos actividad que la proteína nativa, esta puede expresarse a mayor titulación y localizarse en cualquier parte en la especie de la planta. Informes previos de plantas transgénicas que expresan enzimas celulasas han explicado la eliminación de las señales de secreción que contienen las enzimas celulasas en el citosol de las células. Esto no es necesario con el uso de las proteínas modificadas con inteína y es una mejora sustancial dado que la proteína

modificada puede colocarse en estrecha proximidad con su sustrato, pero no catalizar la reacción hasta que se desee. Además, estas plantas tienen un mayor grado de seguridad ambiental. Dado que los genes transferidos codifican proteínas de sustancialmente menos actividad en condiciones fisiológicas, es menos probable que la transferencia génica horizontal entre especies confiera cualquier ventaja selectiva. Por esta razón, es poco probable que cualquiera de las plantas transgénicas supere a las plantas nativas en su hábitat natural o que la transferencia génica produzca una ventaja selectiva que favorezca a la población transformada.

El Ejemplo 2 demuestra las amplias aplicaciones de esta invención. El Ejemplo 2 muestra una variación del método del Ejemplo 1 para generar una especie transgénica de abeto de Douglas que expresa una lignina peroxidasa modificada con inteína. La elección de una proteína diana específica depende de la aplicación deseada para la especie de planta transgénica. Para este ejemplo, se seleccionó un gen de lignina peroxidasa que facilita la degradación catalítica de la lignina, un componente químico de la madera. Usando una lignina peroxidasa modificada con inteína, toda la planta puede degenerarse al mismo tiempo que se produce la lignina peroxidasa modificada con inteína inactivada en toda la planta a una alta titulación si fuera deseable. La enzima puede activarse posteriormente por la capacidad de auto corte y empalme de la inteína para producir la lignina peroxidasa nativa a una actividad aumentada en comparación con la lignina peroxidasa modificada con inteína. Esto permite el control mejorado de la actividad de lignina peroxidasa que no está actualmente disponible. Dicha especie de planta transgénica es valiosa para la producción de pulpa, piensos para animales, sustratos para otros procesos, mejoras para la formación de pulpa mecánica, bioblanqueamiento de pulpa, mejoras para reducir los residuos del procesamiento de pulpa y la producción de biopolímeros con propiedades únicas.

20 Construcción de genes y proteína modificada con inteína

Tal como se indicó anteriormente, cualquier proteína nativa es adecuada como proteína diana, y su selección depende del objetivo previsto para la planta. En este ejemplo, una especie de abeto de Douglas que puede modificar su propia lignina es beneficiosa como un sustrato para los diferentes procesamiento de pulpa. El ácido nucleico que codifica la proteína de interés puede aislarse de *Phanerochaete chrysosporium*. Un cebador se empareja preferentemente con extremo 5' de la cadena sentido a amplificar, y el otro con el extremo 5' de la cadena de ADN complementaria en el extremo del gen. Es beneficioso tener exclusividad de secuencia relativa.

Purificación de fragmentos PCR del gel

La purificación del ácido nucleico del gel se realiza usando electroelución, extracción con fenol, digestión con agarosa, extracción con perlas de vidrio, o a partir de diversos kits disponibles en el comercio. Preferentemente, se utiliza el Kit de Extracción de Gel QIAquick disponible en el comercio de Qiagen (Valencia, CA).

Selección de inteína

La selección de la inteína depende del uso previsto de la planta y de la proteína modificada con inteína. Existen muchas inteínas diferentes que pueden utilizar. En este ejemplo, una inteína con las mismas propiedades como las del Ejemplo 1 es beneficiosa para el uso deseado de una especie transgénica de abeto de Douglas. Por tanto, se usa preferiblemente una variante de la inteína de polPsp de *Pyrrococcus* spp. La ventaja de esta inteína es que después del corte y empalme esta produce predominantemente una proteína nativa (>75%), ligada, y es sensible a la temperatura de manera el corte y empalme de la inteína se inhibe a temperaturas menor de 30 °C y no es sustancial hasta 50 °C, donde semivida de la proteína no escindida es menor de 2 horas. Esta inteína induce el corte y empalme *in vitro* mediante un cambio de pH, añadiendo por tanto flexibilidad aumentada al procesamiento posterior de la planta transgénica.

Transformación con vectores

Con el vector incluido dentro de la cepa recombinante de *A. tumefaciens*, la transferencia génica al abeto de Douglas depende del sistema de administración especializado de las bacterias. Se dispone de otros métodos de transferencia génica y la selección de un método de transformación adecuado depende de la fuente del material de planta y de la facilidad con la que puede aplicarse el método. Normalmente se requiere alguna modificación y optimización de los parámetros de transformación.

Usos de árboles recombinantes

El árbol del Ejemplo 2 puede usarse como una fuente de material para la purificación de lignina peroxidasa o lignina peroxidasa modificada con inteína. Como alternativa, este también puede usarse por sí mismo como sustrato para la producción de pulpa de madera en diversas aplicaciones, por ejemplo, producción de papel, piensos para animales, materiales compuestos, etc. Tanto en el Ejemplo 1 como en el Ejemplo 2 se ilustran el uso de árboles, naturalmente otras plantas son opciones útiles y dependen del uso que se pretende de la invención. En muchas áreas estos tipos de árboles no crecen bien y también pueden usarse plantas herbáceas, trepadoras, clorófitas u otras especies de plantas. Además, muchos frutos y hortalizas pueden beneficiarse de la tecnología de proteínas modificadas con inteína, tal como, por ejemplo, para inducir la maduración, la resistencia a pesticidas, o cualquier serie de aplicaciones distintas. Por tanto la elección de la planta hospedadora es no limitante. El uso de plantas como fuentes para proteínas recombinantes se facilita mediante el uso de la tecnología de SPIC o inteína de la presente invención.

Se fabrican plantas para que expresen un número cualquiera de proteínas de fusión, en las que el punto de fusión está formado por una inteína que no facilita la recombinación de las proteínas exteínas condensadas, sino que une la proteína deseada a una proteína de unión para la purificación mediante una cromatografía de afinidad. En este caso, la proteína deseada puede o no tener la actividad completa *in vivo*. Tras ser expresada en la planta, la proteína de fusión se eluye en una columna de afinidad, en donde la porción de unión de la proteína de fusión se une a la columna. Después la columna se trata para inducir el corte de la inteína, y la proteína deseada se retira mediante lavado y se recupera. Otra variación de la invención que tiene un interés médico es una proteína de fusión que comprende una vacuna o proteína terapéutica condensada mediante inteínas para proteger a grupos de proteína. Esta proteína terapéutica puede ser expresada en una planta e ingerida por un ser humano o un animal no humano, por ejemplo, en el caso de vacunación de animales o tratamiento hormonal. El corte de la inteína después se produce *in vitro* o dentro del paciente o animal, debido al cambio de pH dentro del estómago o a un gradiente de tior inducido por la ingestión de un tercer producto químico. El corte retira los grupos protectores de proteína, con lo cual se obtiene la vacuna o proteína terapéutica nativa, que entonces es absorbida en el intestino.

Cualquiera de los árboles transgénicos que expresen proteínas modificadas con inteína de los Ejemplos 1 y 2 puede usarse eficazmente en un proceso a escala industrial como se muestra en el Ejemplo 3. La propia elaboración de pulpa puede potenciarse mediante una modificación similar a la usada en el Ejemplo 2 para la especie de abeto de Douglas.

Procesamiento de los árboles

Los procesos de pretratamiento típico para la degradación de sustratos lignocelulósicos incluyen pretratamiento con ácido concentrado (normalmente ácido sulfúrico), pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con explosión de amoníaco y pretratamiento con agua caliente. Son posibles otros procesos de pretratamiento y el diseño de los árboles transgénicos que expresan una proteína modificada con inteína debe optimizarse para aprovechar por completo un proceso de pretratamiento cuando sea necesario. El corte y empalme de la inteína puede producirse en un recipiente mediante cualquier método conocido, tal como, pero sin limitación: cambio de pH, de temperatura, exposición a la luz, estimulación acústica o cualquier adición química exógena.

Usos deseados y variaciones del proceso

Las variaciones preferidas del proceso del Ejemplo 3 incluyen combinar las etapas de pretratamiento, de corte y empalme, de digestión y de fermentación. Esta consolidación de procesamiento preferido puede producirse entre cualquiera de las etapas, sin embargo, una manifestación preferida incorpora todas las etapas simultáneamente en una sola operación unitaria. Esta combinación preferida puede reducir costes disminuyendo los gastos de capital y de amortización, disminuyendo el coste de los sustratos, disminuyendo el coste energético dependiente del proceso y el suministro de productos químicos en el proceso. Además, a diferencia de los procesos químicos competitivos que elaboran los mismos productos, pueden obtenerse beneficios ambientales disminuyendo las emisiones y la generación de residuos tóxicos. En el Ejemplo 3 la elección del producto depende del organismo usado en la fermentación para la bioconversión deseada. Cualquier organismo que, como sustrato pueda utilizar adecuadamente la celulosa degradada, puede usarse para producir eficazmente un producto deseado. Por esta razón, el espectro de productos finales que puede crearse es muy grande. Las aplicaciones que se beneficiarán de sustratos con atributos de procesamiento preferido facilitado por las plantas portadoras de proteínas modificadas con inteína de la presente invención incluyen, sin limitación, producción de combustible, producción de productos químicos, producción de textiles, producción de biopolímeros, producción de alimentos y sacarificación. Aunque el Ejemplo 3 está más enfocado a la fermentación de las plantas transgénicas degradadas, las plantas modificadas con inteína también pueden usarse como sustratos para procesos químicos tradicionales. Por ejemplo, las plantas del Ejemplo 2 pueden usarse preferentemente en la fabricación de pasta de papel. En dicho proceso, los beneficios se obtienen por la disminución de los productos químicos rigurosos que se usan para blanquear la madera. Probablemente esto producirá una reducción de los costes de suministros químicos, generación de material tóxico y contaminante y posiblemente alguna consolidación en el procesamiento. Otro uso es el de la pectinasa para el desuado del algodón o las células para otros procesos de producción textil. En estos casos, los productos finales proceden de procesos químicos más tradicionales, no obstante a través del uso de sustratos de plantas con proteínas modificadas con inteína se incrementen los beneficios, a diferencia del medio procesamiento con productos químicos normalmente rigurosos generalmente empleados.

El pienso para animales se complementa habitualmente con una diversidad de enzimas usadas para aumentar el valor nutricional del pienso, así como para disminuir la carga ambiental producida en las proximidades donde acumulación de estiércol animal es sustancial. El valor nutricional aumenta a través de la supuesta acción enzimática sobre polímeros vegetales, que ayuda al animal a digerir el pienso y por lo tanto utilizar más de los componentes beneficiosos del pienso. La carga ambiental puede reducirse limitando las cantidades de minerales añadidas, tales como fosfato inorgánico, que puede obtenerse de las propias plantas en presencia de la enzima activa. Los beneficios asociados con el uso de las proteínas modificadas con inteína, a diferencia de las proteínas no modificadas, da como resultado una expresión multiproteína, a altos niveles, que no interfiere con la regeneración de la planta incluso confiere una actividad enzimática deseada después del corte y empalme en el estómago de los animales. Esto disminuye el coste del pienso administrando las enzimas dentro de la propia comida, a diferencia de su producción exógena y añadida a la comida. Además, el beneficio añadido del uso de genes que codifican

proteínas apenas inactivas *in vivo* en plantas, proporciona una plataforma tecnológica que es menos probable que esté asociada con riesgos ambientales asociados con la transferencia génica horizontal a especies de plantas nativas. Este entorno ventajoso, ya sea real o percibido, incide en el mantenimiento de todos los productos de plantas con proteínas modificadas con inteína. El Ejemplo 4 ilustra la construcción de una fitasa modificada con inteína en semilla de colza para su uso en piensos animales.

Usos y variaciones

La fitasa es una enzima que ayuda en la transformación de fósforo inorgánico a partir de mioinositol fosfatos contenidos intrínsecamente en la comida de los animales. Un impacto económico se lleva a cabo a través de una disminución en la cantidad de complementación de fosfato necesaria para la producción del pienso animal, y una disminución en el contenido de fosfato del estiércol del animal, que contribuye a la contaminación de aguas locales. Aunque el Ejemplo 4 a continuación ilustra la construcción y uso de una fitasa modificada con inteína expresada en semilla de colza para pienso animal, también pueden usarse diversas otras proteínas nativas valiosas. Por ejemplo, la fitasa puede sustituirse con, o usarse además de cualquier número de celulasas, amilasas, glucanasas, hemicelulosas, pectinasas, proteasas, xilanasas, lipasas, hormonas del crecimiento o antígenos inmunogénicos, entre otras. Cada una de estas otras proteínas tiene un posible valor económico en el uso de la complementación del pienso de animales.

El Ejemplo 5 ilustra una de las realizaciones preferidas de la invención. Se construye un maíz transgénico y se usa como sustrato para el procesamiento de etanol. En este caso, la secuencia génica modificada con inteína del Ejemplo 1 se usa de nuevo solo con fines demostrativos. Sin embargo, en una realización preferida, pueden expresarse diversas proteínas modificadas con inteína simultáneamente para optimizar el atributo de procesamiento de degradación de la planta deseada para su uso en el proceso de fermentación. Las enzimas diana pueden seleccionarse de enzimas normalmente conocidas como celulasas (E.C. 3.2.1.4), exocelobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91), glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), y pueden expresarse óptimamente con otras enzimas seleccionadas de la Clasificación de Enzimas registro 3.2.1.x, o de cualquier otro grupo de clasificación necesaria. Además de la expresión simultánea de las proteínas modificadas con inteína múltiples, la composición preferida de la realización en cuestión es una planta fértil que puede reproducirse y transmitir su herencia génica estable.

Información de transformación

Los macroproyectiles se usan para acelerar los microproyectiles que se introducen en las células de las plantas.

Habiendo ahora descrito en líneas generales la presente invención, esta se entenderá mejor haciendo referencia a determinados ejemplos específicos, que se incluyen en el presente documento solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención ni ninguna de sus realizaciones, a menos que se especifique y cuando se especifique.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de álamo transgénico que expresa una celulosa modificada con inteína

Para este ejemplo se usó una enzima celulasa. En primer lugar se ensambló un vector que contenía la secuencia codificante de ADN de la proteína modificada con inteína. Para construir dicho vector, primero se prepara una secuencia de ADN de proteína modificada con inteína y después se integra en el vector deseado. La proteína deseada para esta planta es una celulasa aislada de *Bacillus* sp. NBL420. El gen correspondiente a esta proteína se amplifica usando PCR a partir de un molde de ADN genómico aislado de *Bacillus* sp. NBL420. La reacción PCR se realiza mezclando el ADN molde, dos cebadores complementarios con los extremos 3 del ADN molde a amplificar, Taq ADN polimerasa, tampón de reacción (KCl 500 mM, Tris-Cl 100 mM, pH 9,0, Tritón X-100 al 0,1%) y MgCl₂ en un tubo de PCR de paredes finas de 250 µl. Una vez mezclados, cada tubo de reacción se coloca en un termociclador, y el termociclador se ajusta durante 35 ciclos comprendidos en tres segmentos: 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 120 segundos. Después de la amplificación, el producto PCR resultante se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1% junto con patrones de peso molecular (Invitrogen, Carlsbad, CA), usando un tampón de desarrollo 1X TAE (o TBE) y se tiñe con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Debe prestarse atención para garantizar que se ha obtenido la banda de tamaño apropiado, de aproximadamente 3200 pares de bases (pb). Después, esta banda se extrae del gel con un escalpelo, y se purifica (se separa del material del gel) usando un kit de purificación en gel disponible en el comercio (Qiagen). Una vez que el fragmento se ha purificado del gel, la banda se analiza usando digestión con enzimas de restricción o secuenciación como describen Ausubel *et al.*, Current Protocols en Molecular Biology, Wiley, Nueva York (1998). Después de la amplificación génica, el gen se modifica por inserción del segmento de la secuencia de inteína. En este caso, se usa una variante de la inteína de polPsp de *Pyrrococcus* spp. Esta variante, descrita en la bibliografía, contiene una mutación en el resto 534 de tirosina que convierte esa tirosina en metionina. Véase, Xu, M, Perler, F, (1996). The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation, The EMBO Journal 15: 5146-5153. Esta inteína puede escindirse *in vitro* mediante un cambio de pH. La secuencia codificante de esta inteína se amplifica después por PCR usando, como molde, ADN genómico de *Pyrrococcus* spp. La reacción PCR se realiza usando un protocolo convencional (por ejemplo, 30 ciclos comprendidos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 120 segundos) y los siguientes cebadores.

5'-ATTATGTGCATAGAGGAATCCAAAG-3' [SEQ ID NO: 5]

5'-AGCATTTTACCGGAAGAATGGGTTC-3' [SEQ ID NO: 6]

Una vez completada la amplificación, el producto PCR se transfiere a y se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE o TBE 1X. La banda resultante se purifica después y se analiza según se ha descrito anteriormente para la secuencia codificante de celulasa nativa. En este momento se unen los dos fragmentos de PCR mostrados en la Figura 1, uno que codifica la proteína celulasa y otro que codifica la secuencia polipeptídica de inteína. En este caso, la inteína se inserta en fase en la proteína nativa, de tal manera que un resto serina de la proteína natural comienza en el aminoácido C-exteína terminal en el punto de unión entre la inteína nativa y la C-exteína de la proteína nativa. Este segmento de proteína modificada con inteína se produce usando PCR amplificando primero la secuencia codificante C-exteína del gen de la celulasa. Los cebadores que se solapan tanto con la C-exteína como con el extremo de inteína que contiene los codones de histidina y asparagina inmediatamente adyacentes a la C-exteína se usan para amplificar la secuencia C-exteína:

5'-CTTTGGATTCTCTATGCACATAATTCCGGAACGGCGGTGTCTACCTCG-3' [SEQ ID NO: 7]

5'-CGTGTCTGCTCCGTTTACCGCTTTTAAATTGGACGAATTTGTGCGTGA-3' [SEQ ID NO: 2]

La secuencia resultante tiene una longitud de 604 nucleótidos. La inteína se amplifica después usando un cebador en sentido que contiene tanto el extremo de inteína, que contiene el codón de serina terminal, como el extremo N-exteína del gen de la celulasa, junto con un cebador antisentido que contiene nucleótidos específicos de la inteína y C-exteína. Para esta reacción PCR se usan los siguientes cebadores para obtener una secuencia 1661 nucleótidos de longitud:

5'-AGAGAATGGGGAACGAGCGATGCTAGCATTTTACCGGAAGAATGGGTTC-3' [SEQ ID NO: 1]

5'-CGAGGTAGACACCGCCGTTTCCGGAATTATGTGGATAGAGGAATCCAAAG-3' [SEQ ID NO: 8]

Después, la N-exteína se amplifica usando PCR y un cebador que contiene nucleótidos específicos de la cadena sentido de N-exteína y otro cebador que contiene nucleótidos específicos de la N-exteína y la secuencia de inteína adyacente. La parte N-exteína del gen de la celulasa se amplifica con los siguientes cebadores dando como resultado una secuencia de 1541 nucleótidos de longitud.

5'-AGCATTCAGACCTCCCATTTCATACGAAAAGAGGAAATAGATAGATTTTC-3' [SEQ ID NO: 9]

5'-GAACCCATTCTTCCGGTAAAATGCTAGCATCGCTCGTTCCCCATTCTGTG-3' [SEQ ID NO: 10]

Una vez finalizadas estas tres reacciones, cada fragmento de la PCR se limpia para eliminar cebadores residuales, y los fragmentos C-exteína, inteína y N-exteína de PCR se unen realizando dos reacciones en cadena de la polimerasa más. La inteína y una de las regiones de exteína de la celulasa, la C-exteína o la N-exteína, se amplifican en una sola reacción mezclando porciones equimolares de los dos fragmentos de PCR generados anteriormente y realizando la PCR como se ha descrito anteriormente. Esta reacción no requiere cebadores extra externos y da como resultado la primera fusión de inteína-exteína. Esta mezcla de reacción se limpia y después porciones equimolares del producto de fusión limpio se mezclan con la parte de exteína restante y la PCR se realiza una vez más sin añadir cebadores adicionales. No se requieren cebadores exógenos en ninguna de las dos últimas reacciones de PCR, y la hibridación se produce en las uniones de inteína-exteína. Las regiones hibridadas se extienden a través de la Taq polimerasa obteniéndose los productos de fusión finales. Esta secuencia de reacción da como resultado la secuencia codificante de la proteína modificada con inteína con la inteína insertada en la posición exacta deseada. El producto de la reacción final se limpia de nuevo, y se amplifica usando PCR una última vez con cebadores específicos para los extremos de exteína de la celulasa con terminaciones específicas para facilitar el ligamiento en el vector de clonación. Una vez finalizada esta reacción, los productos de PCR se procesan en un gel de agarosa, y la banda apropiada, de 3806 nucleótidos de longitud, se purifica del gel y se analiza de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. La secuencia codificante (segmento de ácido nucleico) de la proteína modificada con inteína resultante contiene un sitio de unión al ribosoma, un codón de inicio en el principio, de la N-exteína, la secuencia completa de la celulasa modificada con inteína con la inteína insertada en fase en la orientación adecuada y un codón de terminación en el extremo de la secuencia codificante de C-exteína. La secuencia codificante de celulasa modificada con inteína se clona después en pTiBo542, sustituyendo los genes tms y tmr en el ADN T, usando los métodos descritos en Ausubel, *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1998). Véase Parsons TJ, Sinkar, VP, Stettler, RF, Nester, EW, Gordon, MP, "Transformation of Poplar by *Agrobacterium tumefaciens*," Biotechnology 4: 533-536, 1986. Aquí el casete de expresión incluye un promotor "MAC", un terminador de mannopina sintetasa, y un marcador de resistencia a kanamicina. Este vector se transforma en *A. tumefaciens* A281 usando cualquier método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, electroporación, o el método de cloruro de calcio). También se describen diversos métodos de transformación en Ausubel, *et al.* (1998), citado anteriormente.

Para transformar la especie vegetal H11, *Populus trichocarpa x deltoides*, con la *A. tumefaciens* recombinante, se emplea una variación del método de disco foliar. La *A. tumefaciens* recombinante se cultiva en medio selectivo que

contiene medio MG al 50% (manitol 10 g/l, glutamato sódico 2,32 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, NaCl 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, biotina 0,002 g/l, pH 7,0), caldo de Luria al 50% (triptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 10 g/l) y antibiótico apropiado, a 30 °C en una incubadora con agitación. Para la transformación de la planta, pequeños cortes del tallo de madera verde, de aproximadamente 7 mm de longitud y 2-3 mm de diámetro, se esterilizan con lejía al 20%, Tween 20 al 0,1% y fungicida sistémico benomilo 30 mg/l (Chas. H. Lilly Co., Portland, OR). Después de lavar con agua estéril, los cortes de tallo se transfieren asépticamente a un cultivo de *A. tumefaciens* a una concentración celular de aproximadamente 5×10^8 células por ml y los cortes se dejan incubando durante 16 horas. Después de exposición al cultivo de *A. tumefaciens* recombinante, los tallos de la planta se transfieren a medio de Murashige-Skoog complementado con ribósido de zeatina y kanamicina en una posición vertical. Véase Murashige T, Skoog F, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiol. Plant*, 15: 473-497, 1962. Una vez que las raíces han comenzado a crecer, se desarrollarán los brotes. Las plantas en regeneración se transfieren a placas recientes cada dos a tres semanas, y se mantiene un ciclo de luz normal durante el crecimiento de la planta y a humedad elevada en la incubadora. Una vez formadas las raíces, los explantes se transfieren a un medio sólido sin ribósido de zeatina, pero que contiene kanamicina, durante otras dos a tres semanas, periodo después del cual las plantas se transfieren a cajas que contienen suelo durante cuatro a cinco días antes de replantarlas en suelo y crecen por completo en un invernadero o en una parcela de suelo controlada. Las plantas iniciales se exploran mediante diversos métodos para garantizar que la secuencia de ADN de celulasa modificada con inteína se ha transferido al genoma y que la expresión de la proteína es activa. La exploración genética se realiza mediante análisis de Southern en ADN genómico aislado de la planta transgénica usando, como sonda, la secuencia codificante de celulasa modificada con inteína, como describen Ausubel, *et al.* (1998), anteriormente. La PCR se realiza usando sondas específicas para la secuencia codificante de celulasa modificada con inteína y como molde el ADN genómico de la planta transgénica, como se describe anteriormente. La aparición de la banda del tamaño apropiado en un gel teñido con bromuro de etidio verifica la presencia de la secuencia codificante de la celulasa modificada con inteína. También puede realizarse la secuenciación directa del ADN genómico de la planta. La producción de la proteína se controla mediante análisis de Western usando anticuerpos específicos contra la celulasa modificada con inteína y contra la celulasa nativa. Además, en la técnica se conocen ensayos enzimáticos para determinar la actividad celulasa y pueden usarse para cuantificar la actividad de la celulasa modificada con inteína no cortada ni empalmada y de la celulasa cortada y empalmada.

Ejemplo 2: Producción abeto de Douglas transgénico que expresa lignina peroxidasa modificada con inteína

Este ejemplo usa el mismo método para construir el vector que contiene la secuencia codificante de lignina peroxidasa modificada con inteína como se usa en el ejemplo uno. Las diferencias principales son: el plásmido de *A. tumefaciens* empleado, la secuencia de proteína nativa que se modifica, y los cebadores seleccionados para amplificar la nueva secuencia codificante de lignina peroxidasa modificada con inteína.

El gen de la lignina peroxidasa se amplifica por PCR usando, como molde, ADN genómico de *P. chrysosporium*. En la reacción PCR se usan los cebadores

5'-ATGGGCTTCAAGCAGCTCGTCGCAG-3' [SEQ ID NO: 11]

5'-TTAAGCACCCGGCGGCGGGGGGCTG-3' [SEQ ID NO: 12]

como se describe en el Ejemplo uno. Después de la amplificación, el producto de PCR resultante se analiza usando electroforesis en gel en un gel de agarosa, junto con patrones de peso molecular como se describe en el ejemplo uno. Después de teñir el gel con bromuro de etidio, la banda de 1567 pares de bases (pb) se extrae del gel con un escalpelo y se purifica del gel como se ha descrito anteriormente. Después de purificar el fragmento del gel, el fragmento se analiza usando digestión con enzimas de restricción o secuenciación para la verificación directa como describen Ausubel, *et al.*, 1998.

Después de amplificar el gen, este se modifica por inserción de la secuencia de inteína en la secuencia del gen. Para este ejemplo, se usa la misma inteína que la del Ejemplo uno. La secuencia codificante de esta inteína se amplifica de la misma manera que la descrita en el Ejemplo uno. La secuencia de ADN de inteína resultante se purifica por electroforesis en gel y se analiza según se ha descrito anteriormente.

Los dos fragmentos de la PCR, uno que codifica la lignina peroxidasa y el otro que codifica la secuencia polipeptídica de inteína se unen. Para garantizar el correcto corte y empalme de la inteína, la inteína se inserta en fase cerca de un resto de serina de la lignina peroxidasa de tal manera que esta serina esté en el lado del ácido carboxílico, de los restos conservados histidina - asparagina de esta inteína, en las posiciones de aminoácidos 536 y 537 terminales de inteína, respectivamente. La inteína se inserta en la proteína nativa, de tal manera que el resto de serina de la proteína nativa se convierte en el aminoácido terminal de la C-exteína en el punto de unión entre la inteína nativa y la C-exteína de la proteína nativa. La inteína se coloca dentro de la proteína nativa de tal manera que su presencia reduce sustancialmente la actividad de la proteína modificada con inteína resultante. En la mayoría de las circunstancias prácticamente cualquier resto de serina dentro o cerca del sitio activo de la molécula cumplirá con este criterio, sin embargo será necesario alguna optimización.

La secuencia de la proteína modificada con inteína se produce usando la misma PCR que la descrita en el Ejemplo uno, siendo la única diferencia la elección de los cebadores. La parte C-exteína del gen de la lignina peroxidasa se amplifica usando el producto génico limpio de la reacción de PCR anterior, y los siguientes cebadores, dando como resultado una secuencia de 445 nucleótidos:

5 5'-CTTTGGATTCTCTATGCACATAATTCTCGCCCGCGACTCCCGCACCGCT-3' [SEQ ID NO: 13]

5'-TAAGCACCCGGCGGCGGGGGGCTGGAAGAGGAATATGTCAGCTGGGGGC-3' [SEQ ID NO: 14]

La parte N-exteína del gen de la lignina peroxidasa se amplifica por PCR usando el mismo molde y los siguientes cebadores.

5'-ATGGCCTTCAAGCAGCTCGTCGCAGCGATTTCCCTCGCACTCTCGCTCAC-3' [SEQ ID NO: 15]

10 5'-GAACCCATTCTTCCGGTAAATGCTGTGTGGTCGGTCTGGATGCGGATCT-3' [SEQ ID NO: 16]

La secuencia resultante tiene una longitud de 1196 nucleótidos. La secuencia codificante de inteína a colocar en el gen de la lignina peroxidasa se amplifica usando PCR como se describe en el Ejemplo uno. En esta reacción se usa un molde de ADN genómico de *Pyrococcus* spp y los siguientes cebadores:

5'-AGATCCGCATCCAGACCGACCACACAGCATTTTACCGGAAGAATGGGTTC-3' [SEQ ID NO: 17]

15 5'-GCGGTGCGGGAGTCGCGGGCGAGAATTATGTGCATAGAGGAATCCAAAG-3' [SEQ ID NO: 18]

La secuencia resultante tiene una longitud de 1661 nucleótidos. Una vez realizadas estas reacciones, los productos de reacción se someten a electroforesis en un gel de agarosa, se purifican del gel y se analizan como se ha descrito anteriormente. Las partes exteína e inteína se unen como se describe en el Ejemplo uno. En este caso, el fragmento de inteína se mezcla con una parte equimolar del fragmento de C-exteína de la lignina peroxidasa. La combinación de estos fragmentos representa tanto el molde como los cebadores necesarios para la reacción PCR. La PCR se realiza usando las mismas condiciones de reacción que las indicadas en el Ejemplo uno. Una vez completada, los productos de la PCR se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda apropiada, de 2106 nucleótidos de longitud, se purifica del gel. La banda purificada se analiza según se describe en el Ejemplo 1. Después, una pequeña cantidad del producto de reacción purificado se cuantifica midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro UV.

La secuencia codificante de ADN de la proteína modificada con inteína se completa con una reacción(es) de PCR. Cantidades equimolares del fragmento fusionado de C-exteína e inteína recién construido se combinan con el fragmento de N-exteína purificado anteriormente. La reacción PCR se realiza usando las mismas condiciones que las de las reacciones anteriores. Los productos de reacción se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, la banda apropiada, de 3302 nucleótidos de longitud, se purifica del gel y se analiza de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo uno. La secuencia codificante de la proteína modificada con inteína final tiene la secuencia de inteína completa en fase, en la orientación adecuada, dentro de la secuencia codificante de la lignina peroxidasa.

La secuencia codificante de la lignina peroxidasa modificada con inteína se clona en un casete de expresión de plantas. En este caso, se usa el plásmido pTiA6 con resistencia a kanamicina y que carece de los genes de octopina sintetasa, pero que contiene las secuencias de control de la transcripción de la octopina. La lignina peroxidasa modificada con inteína se liga en un pTiA6 restringido bajo las secuencias de control de la transcripción de la octopina (promotor y sitio de poliadenilación 3). Una *A. tumefaciens* K12X562 se transforma usando el vector ligado resultante, y cualquier método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, electroporación o el método de cloruro de calcio). Ausubel *et al.* (1998) describen los métodos de transformación.

El abeto de Douglas se transforma, con la *A. tumefaciens* recombinante y los segmentos nodales o semillas muestreadas de estos árboles. La multiplicación y la elongación de los brotes se realizan como se ha descrito anteriormente (Gupta PK, Durzan, DJ, "Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir, and sugar pine, "Plant Cell Reports, 9: 177-179, 1985) en cultivo en placas de medio basal DCR. Un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante se desarrolla de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo uno. Para la transformación de la planta, los brotes regenerados del cultivo, de aproximadamente 50 mm de longitud, o las semillas, se esterilizan superficialmente por tratamiento con lejía al 10% y Tween 20 al 0,1%. Una vez esterilizados, los brotes o las semillas se aclaran asépticamente con agua estéril, destilada y desionizada. Las semillas y los brotes se transforman lacerando primero el tejido epidérmico con una aguja estéril o cortando la superficie con un escalpelo estéril. Los brotes o semillas laceradas se sumergen en un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante a una concentración celular de aproximadamente 5×10^8 células por mli. Después de 12 horas de exposición al cultivo de *A. tumefaciens* recombinante, los brotes y las semillas se cultivan en medio basal DCR con sacarosa al 2,2% y agar Bacto (Difco) al 0,8%. Las condiciones de cultivo incluyen un ciclo de luz de 16 horas a 25 °C, seguido de un ciclo de oscuridad de 8 horas a 20 °C en un invernadero o en una cámara de cultivo. Las plantas en regeneración se transfieren a placas recientes cada dos a tres semanas. Una vez formadas las raíces, los explantes se transfieren a cajas que contienen suelo durante cuatro a cinco días antes de replantarlos en suelo y se crecen por completo en un invernadero o en

una parcela de suelo controlada. El primer año de crecimiento se realiza en un invernadero en condiciones de temperatura controlada, que no superan los 30 °C.

Las plantas se exploran usando métodos similares a los del Ejemplo uno, salvo los específicos para la proteína lignina peroxidasa o la proteína lignina peroxidasa modificada con inteína en el caso del análisis de Western.

- 5 La especie de abeto de Douglas transgénica resultante se desarrolla indefinidamente produciendo al mismo tiempo la lignina peroxidasa modificada con inteína a una alta dosis. La lignina peroxidasa se activa posteriormente usando los mismos métodos que los descritos en el Ejemplo uno ya que en este ejemplo se empleó la misma inteína para la modificación.

10 **Ejemplo 3: Proceso de preparación de sustratos de fermentación usando plantas que expresan proteínas modificadas con inteína**

En el caso del Ejemplo uno, como sustrato para la producción de etanol mediante fermentación puede usarse la especie de álamo transgénico. Para este proceso el árbol transgénico se recoge usando una herramienta adecuada, tal como un serrucho de cadena o un hacha. Posteriormente el árbol se despulpa usando un extractor de pulpa mecánico. Después la pulpa se coloca en un tanque. Después de haber realizado cualquier tratamiento previo necesario, se induce el corte y empalme de la inteína aumentando la temperatura del tanque y disminuyendo el pH a un valor de 4. Dependiendo del tratamiento previo usado, el corte y empalme de la inteína puede estimularse mediante el tratamiento previo y por lo tanto se produce en paralelo con esa operación de proceso. Una vez realizado el corte y empalme de la enzima nativa la actividad comienza digiriendo la celulosa de la pulpa, aumentando la concentración de monosacáridos.

20 Después de la inducción del corte y empalme, el contenido del recipiente de sacarificación se mezcla en cualquier proporción con la pulpa del álamo nativo o con otros sustratos, para facilitar la degradación de la celulosa de estos sustratos. La proporción de la mezcla depende de la actividad celulasica del álamo transgénico que está en función de la cantidad de celulasica modificada con inteína expresada en la planta, de la eficiencia del corte y empalme, de la eficiencia de la recombinación y de la actividad de la celulasica nativa recombinada presente en el sustrato. Cada uno de estos parámetros tiene un amplio espectro de valores posibles y puede optimizarse para facilitar la economía del proceso.

Después, la glucosa resultante se esteriliza por filtración de la celulosa degradada a través de un filtro de 0,22 µm (o menor), o se esteriliza con calor en modo discontinuo o continuo a través de un intercambiador de calor. La glucosa esterilizada se suministra a un proceso de fermentación, donde puede usarse como un sustrato para la producción de etanol como se describe en la bibliografía. Véase, H. K. Sreenath y T. W. Jeffries, "Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts," *Bioresource Technology*, 72(3): 253-260, 2000; Lisbeth Olsson y Barbel Hahn-Hagerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production," *Enzyme and Microbial Technology*, 18(5): 312-331, 1996; Kutluo O. Ulgen, *et al.*, "Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB", *Process Biochemistry*, 37(10): 1157-1168, 2002; M. Mete Altintas, *et al.*, "Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors," *Enzyme and Microbial Technology*, 31(5): 640-647, 2002; Farooq Latif, *et al.*, "Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts," *Bioresource Technology*, 77(1): 57-63, 2001.

El proceso de fermentación se realiza en modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

Ejemplo 4: Plantas que expresan una proteína modificada con inteína usada para piensos animales

40 Se construye una semilla de colza transgénica siguiendo esencialmente los mismos métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, con las siguientes modificaciones. En la construcción de la SPIC o secuencia génica modificada con inteína, puede usarse la misma secuencia codificante de inteína; sin embargo, en este caso se fusiona con la fitasa expresada por *Aspergillus ficuum*. En este ejemplo, la proteína modificada con inteína seleccionada depende de la acidez del estómago del animal para inducir el corte y empalme de la proteína. La fitasa seleccionada se escogió debido a su alto nivel de actividad a bajo pH (van Ooijen *et al.* (2000), Publicación de Patente de Estados Unidos N° 6.022.846). La parte C-exteína de la fitasa se amplifica en las mismas condiciones a las previamente descritas usando los siguientes cebadores

5'-CTTTGGATTCTCTATGCACATAATTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCA-3' [SEQ ID NO: 19]

5'-CTAAGCAAAACACTCCGCCCAATCACCGCCAGATCTGGCAAAGCTCAACC-3' [SEQ ID NO: 20]

50 La secuencia resultante tiene una longitud de 627 nucleótidos. La secuencia de inteína se amplifica en las mismas condiciones a las previamente descritas usando los cebadores

5'-AGTGACCTACCTCATGGACATGTGCAGCATTTTACCGGAAGATGGGTTC-3' [SEQ ID NO: 21]

5'-GCTGGTGGAGATGGTGTGGAAGGAATTATGTGCATAGAGGAATCCAAAG-3' [SEQ ID NO: 22]

Finalmente la N-exteína se amplifica usando cebadores que producen un fragmento PCR de 928 nucleótidos de longitud.

5'-ATGGGTGTCTCTGCCGTTCTACTTCCTTTGTACCTCCTGTCCGGAGTATG-3' [SEQ ID NO: 23]

5'-GAACCCATTCTTCCGGTAAATGCTGCACATGTCCATGAGGTAGGTCACT-3' [SEQ ID NO: 24]

- 5 Los fragmentos de ADN resultantes se limpian y se analizan, después se combinan usando PCR y los métodos asociados descritos en los Ejemplos 1 y 2. Este procedimiento produce la secuencia codificante de fitasa modificada con inteína. Después, el compuesto final, la secuencia fitasa modificada con inteína se amplifica, se limpia y se analiza como se describe en los Ejemplos 1 y 2. La secuencia codificante de ADN fitasa modificada con inteína se clona en el mismo casete de expresión, y se usa para transformar *A. tumefaciens* como se describe en el Ejemplo 2.
- 10 Los segmentos de tallo de semilla de colza se transforman usando la *A. tumefaciens* recombinante resultante. La transformación se produce sustancialmente como se describe en los Ejemplos 1 y 2 con las siguientes modificaciones. Los segmentos del tallo de plantas de semilla de colza de cinco a seis semanas de vida se esterilizan en la superficie usando una solución de lejía al 20% durante 25 minutos a temperatura ambiente. Después de la esterilización, los segmentos del tallo se aclaran asépticamente con agua estéril, destilada y desionizada. Los segmentos se preacondicionan por incubación durante 24 horas en medio Murashige-Skoog complementado con 1 mg/l de BAP. Una vez transcurridas 24 horas, los segmentos del tallo se incuban durante 48 horas con la cepa de *A. tumefaciens* recién transformada que contiene la fitasa modificada con inteína. Después de esta etapa de incubación, las plantas transgénicas se regeneran y se seleccionan usando el marcador de resistencia a kanamicina, siguiendo sustancialmente los mismos procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2. La confirmación de la incorporación de la fitasa modificada con inteína también puede realizarse como se describe en los Ejemplos 1 y 2.

- La semilla de colza transgénica resultante se cultiva en una zona aprobada de acuerdo con la legislación local. La semilla de soja se cosecha cuando está madura y se usa para complemento en piensos de animales. Por otro lado, la semilla de soja puede cultivarse en terrenos de pasto para los animales dado que el corte y empalme de la inteína debería producirse espontáneamente en el estómago del animal, permitiendo la activación de la actividad fitasa.
- 25

Ejemplo 5: Producción de maíz transgénico que expresa una celulasa modificada con inteína y utilización en la producción de etanol

- Este ejemplo ilustra una manera en la que la invención puede llevarse a la práctica. En este caso, se construye almidón transgénico y se usa como un sustrato para el procesamiento de etanol o como un sustrato en otras fermentaciones. En este ejemplo, la secuencia génica modificada con inteína del Ejemplo 1 se usa de nuevo para la demostración. El crecimiento de cultivos de callos embrionarios de tipo II de *Zea mays* friable, se inicia a partir embriones inmaduros, de aproximadamente 1,6 mm a 1,8 mm de longitud, procedentes de plantas de invernadero de cultivo A188 (University of Minnesota, Crop Improvement Association) x B73 (Iowa State University). Después de la cosecha, los fragmentos se esterilizan en la superficie usando lejía al 50%, durante 25 minutos a temperatura ambiente, y después se lavan con agua estéril, destilada, desionizada. Los nuevos cultivos se inician asépticamente a partir de los fragmentos cosechados y se conservan en no más de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz y 24°C en medio N6 modificado (Chu, *et al.*, (1975), "Establishment of an Efficient Medium for Anther Culture of Rice through Comparative Experiments on Nitrogen Sources," *Sci. Sin.*, 18: 659-668) a pH 5,8, con glicina 2 mg/l, L-prolina 2,9 g/l, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 1 mg/l, hidrolizado de caseína 100 mg/l, sacarosa 20 g/l y solidificado con Gelgro 2 g/l (ICN Biochemicals).
- 30
- 35
- 40

- Después de aproximadamente dos semanas de incubación, la morfología adecuada de los cultivos se evalúa manualmente. Esta observación visual conlleva consistencia friable en presencia de embriones somáticos bien caracterizados. Las proliferaciones que demuestran morfología apropiada se transfieren a medio N6 reciente modificado (descrito anteriormente). Los tejidos resultantes con la morfología adecuada se subcultivan rutinariamente cada dos a tres semanas, hasta que se prepara bombardeo de microproyectiles. La secuencia génica modificada con inteína deseada y el vector de expresión puede construirse como se describe en el Ejemplo 1. En este ejemplo, el vector de expresión preferido también tiene las siguientes modificaciones. Se reemplaza el marcador de resistencia a kanamicina con un marcador de resistencia a higromicina usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR del marcador de resistencia a higromicina a partir de un molde adecuado, restricción de ADN endonucleasa del vector, seguido de purificación y ligamiento del marcador de resistencia a higromicina) como describen Ausubel, *et al.*, 1998. Una vez construido, el vector se precipita en una proporción molar 1:1 sobre partículas de tungsteno (diámetro promedio $1,2 \mu\text{m}$, GTE Sylvania) o de oro. Como con otras etapas en este procedimiento, los parámetros de precipitación pueden requerir alguna optimización sin importancia. La precipitación se realiza combinando 1,25 mg de partículas de tungsteno y 25 μg del ADN del vector en solución con CaCl_2 1,1 M y espermidina 8,7 mM a un volumen total de 575 μl . El precipitado se somete a agitación vorticial durante 10 minutos a 0°C . Una vez sometida a agitación vorticial, la mezcla se centrifuga a 500xg durante cinco minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante, aproximadamente 550 μl , se retira y los restantes 25 μl de precipitado se dispensan en alícuotas de 1 μl sobre macroproyectiles (Biolistics, Inc, Ithaca, NY) para el bombardeo como describen Klein *et al.* (1987), excepto por los cambios indicados anteriormente. Todas las manipulaciones se realizan asépticamente y en hielo.
- 45
- 50
- 55
- 60

Una vez listos los proyectiles biolísticos, los tejidos de la planta deseados se preparan para el procedimiento de bombardeo. Cualquier número de grupos de callos se dispone asépticamente, cada uno pesando 50 mg (peso húmedo), en un patrón x próximo al centro de una placa de Petri estéril de 60 x 15 mm (Falcon 1007). Pueden prepararse diversas placas para cada procedimiento de bombardeo. Cada una de estas placas se coloca una tras otra, 5 cm por debajo de la placa de detención del instrumento de microproyectil. Las placas se ponen en el centro bajo del dispositivo, con las tapas retiradas, y la parte superior de la placa se cubre con un filtro de malla de 3 x 3 mm. El filtro de malla ayuda a que el tejido bombardeado permanezca dentro de la placa durante el procedimiento. El bombardeo del tejido se realiza con el instrumento microproyectil como se describe en las instrucciones del fabricante; los instrumentos microproyectil comerciales se encuentran disponibles en Bio-Rad (Hércules, CA).

Después de bombardeo, los callos se transfieren a placas con medio N6 reciente modificado y se cultivan en las mismas condiciones a las usadas anteriormente.

La selección de células transformadas para la regeneración posterior comienza después de dos días de cultivo. Las placas con callos sometidas al procedimiento de bombardeo se transfieren asépticamente a placas con medio N6 reciente, estéril, modificado, formulado a una concentración final de higromicina B 10 mg/ml (Calbiochem). Después de dos semanas de exposición, todos los callos se transfieren asépticamente de las placas selectivas a placas con medio N6 reciente, estéril, modificado formulado a una concentración final de higromicina B 50 mg/l. Esta transferencia se realiza de tal manera que solo cinco trozos de 30 mg de callos quedan contenidos en una sola placa, dando como resultado una expansión del número de placas usado. Después de tres semanas en las placas de higromicina B 50 mg/l, todos los callos se transfieren asépticamente a placas con malla de medio N6 modificado, estéril, formulado a una concentración final de higromicina B 60 mg/l. Después de dos semanas de incubación se inspeccionan los grupos de proliferación de los callos. Los grupos de proliferación seleccionados se transfieren a medio de Murashige-Skoog modificado complementado con tiamina-HCl 0,5 mg/l, 2,4-D 0,75 mg/l, sacarosa 50 g/l, L asparagina 150 mg/l y Gelgro 2,0 g/l.

En este punto es prudente garantizar la transformación de las plantas seleccionadas. La presencia de celulasa modificada con inteína se verifica usando los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. En este caso, puede usarse cualquiera o ambas de las secuencias codificantes de celulasa modificada con inteína y el marcador de resistencia a higromicina como el sujeto de la validación de transformación, usando métodos conocidos en la técnica, como describen Ausubel, *et al.*, 1998. Después de dos semanas en el medio de Murashige-Skoog modificado, las placas se exponen a un régimen de incubación de ciclo de luz compuesto de 14 horas de luz, seguido de 10 horas de oscuridad a 24 °C. Las plántulas que se forman se transfieren asépticamente a matraces Erlenmeyer de boca ancha de 1 l que contienen 100 ml del medio de Murashige-Skoog modificado. Las plantas resultantes se transfieren a vermiculita durante una a dos semanas antes del trasplantar en el suelo y crecer hasta su maduración. Las plantas maduras se analizan sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1 para garantizar la transformación estable de la secuencia de la proteína modificada con inteína, y preferentemente, la expresión de la celulasa modificada con inteína.

Las plantas maduras resultantes pueden someterse a polinización cruzada usando técnicas convencionales. Esto puede realizarse entre plantas transformadas o entre una sola planta transformada y una planta no transformada. La descendencia resultante de la reproducción se explora para determinar el contenido de la celulasa modificada con inteína, así como el marcador de resistencia a higromicina. Obsérvese, en este punto, que el gen de resistencia a higromicina usado en la selección ya no es un elemento esencial para el uso y aplicación de las plantas de maíz transgénicas construidas. Siempre que la secuencia de celulasa modificada con inteína esté contenida, la retención del marcador de resistencia a higromicina no es un componente esencial del maíz transgénico. La semilla puede cosecharse de las plantas transgénicas fértiles y usarse para la expansión de la planta. Las plantas transgénicas resultantes pueden cultivarse para su uso en procesos similares a los descritos en el Ejemplo 3. El proceso que usa una especie transgénica de maíz que expresa múltiples proteínas modificadas con inteína, tendría las ventajas económicas de utilizar las partes tanto de almidón como celulósicas de la planta de maíz, consolidando las etapas de tratamiento previo, sacarificación y fermentación, y de reducir costes energéticos y de suministro de materias primas. El uso eficaz de este proceso para la producción de etanol permitiría la inclusión de las proteínas modificadas con inteína en las plantas transgénicas.

Los ejemplos que se incluyen no limitan de ninguna manera el alcance de esta patente, ya que únicamente se proporcionan para ayudar a ilustrar las aplicaciones de la invención descrita en esta patente. Como sabrá un experto en la técnica, son posibles otras variaciones y se incluyen dentro del contenido de esta invención.

Bibliografía

Dale, *Biotechnol. Prog.* 15:775-776(1999).

Committee on Biobased Industrial Products, *Biobased Industrial Products: Priorities for Research and Commercialization*, National Academy Press, Washington D C (1999).

Cameron, *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 14: 116-125 (1998).

Park, *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 14: 699-704 (1998).

- Taylor, *et al.*, *Biotechnol Prog.* 16: 541-547 (2000).
- Poirier, *Nature Biotechnology* 17: 960-961 (1999).
- Lynd, *Biotechnol. Prog.* 15: 777-793 (1999).
- Ingram, *Biotechnol. Prog.* 15: 855-866 (1999).
- 5 Aspergren, *et al.*, *Molecular Breeding* 1: 91-99 (1995).
- Mansfield, *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 15: 804-816 (1999).
- Evans, *et al.*, *Protein Science* 7: 2256-2264 (1998).
- Perler, *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 22: 1125-1127 (1994).
- Xu, *et al.*, *EMBO* 15: 5146-5153 (1996).
- 10 Wood, *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 16: 1055-1063 (2000).
- Clarke, P.N.A.S. (USA) 91: 11084-11088 (1994).
- Derbyshire, *et al.*, P.N.A.S. (USA) 95: 1356-1357 (1998).
- Perler, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22: 1125-1127 (1994).
- Wallace, C. J., *Protein Sci.* 2: 697-705 (1993).
- 15 Xu, *et al.*, *Cell* 75: 1371-1377 (1993).
- Petrokovski, S., *Protein Sci.* 3: 2340-2350 (1994).
- Ausubel, *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology," Wiley, New York (1998).
- Draper, *et al.*, "Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual," Blackwell Scientific Publications, Boston (1998).
- 20 Potrykus, *et al.*, "Gene Transfer to Plants," Springer, New York (1995).
- Guilley, *et al.*, *Cell*, 30: 763 (1982).
- Higgins, T. J. V., *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 191 (1984).
- Coruzzi, *et al.*, *EMBOJ.* 3: 1671 (1984).
- Tingey, *et al.*, *EMBOJ.* 6: 3565 (1987).
- 25 Ryan, *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17: 3584 (1989).
- Rocha-Sosa, *et al.*, *EMBO J.* 8: 23 (1989).
- Wenzler, *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 12: 41 (1989).
- Bird *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 11: 651 (1988).
- Brederode, *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 8: 2213 (1980).
- 30 Smeekens, *et al.*, *T.I.B.S.* 15: 73 (1990).
- Van den Broeck *et al.*, *Nature* 313: 358 (1985).
- Schreier, *et al.*, *EMBO J.* 4: 25 (1985).
- Tague, *et al.*, *Plant Phys.* 86: 506 (1988).
- Von Heijne, G., *J. Mol. Biol.* 189: 239 (1986).
- 35 Sijmons, *et al.*, *Bio/Technol.* 8: 217 (1990).
- Gordon-Kamm, *et al.*, *The Plant Cell* 2: 603 (1990).
- Shimamoto, *et al.*, *Nature* 338: 274 (1989).

Horsch, *et al.*, Science 2: 1229 (1985).

Ziegler, *et al.*, Molecular Breeding 6: 37-46 (2000).

Dai, *et al.*, (a), Molecular Breeding 6: 277-285 (2000).

Dai, *et al.*, (b), Molecular Breeding 9: 43-54 (2000).

5 Montalvo-Rodríguez, *et al.*, Biotech. y Bioeng. 2: 151-159 (2000).

Patente de Estados Unidos N° 6.022.846.

Chu, *et al.*, Sci. Sin. 18: 659-668 (1975).

Klein, *et al.*, Nature 327: 70-73 (1987).

REIVINDICACIONES

- 1.- Una planta transgénica que se caracteriza porque porta una construcción de expresión que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína modificada que comprende una proteína diana y una secuencia de inteína condensada internamente dentro de la proteína diana en una posición por la cual la presencia de la inteína inactiva la actividad de la proteína diana, en la que la proteína diana es una proteína de degradación lignocelulósica y la inteína tiene la capacidad de cortar y empalmar la proteína modificada en la conformación cis, y la inteína se selecciona del grupo que consiste en una inteína procedente de la polimerasa de *Pyrococcus* spp., la inteína de Psp pol, y la secuencia codificadora de la inteína de Psp pol puede amplificarse mediante una reacción de PCR empleando los cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, y la actividad de la proteína diana puede recuperarse tras la inducción del corte y empalme de la inteína.
- 2.- La planta transgénica de la reivindicación 1, en la que la construcción de expresión incluye además un segmento de nucleótidos que codifica al menos uno de un marcador seleccionable, un gen indicador y un promotor.
- 3.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la proteína de degradación lignocelulósica se selecciona del grupo que consiste en celulasas que tienen la clasificación E.C. 3.2.1.4, exocelobiohidrolasas que tienen la clasificación E.C. 3.2.1.91, glucosidasas que tienen la clasificación E.C. 3.2.1.21, endocelulasas, exocelulasas, xilanasas, hemicelulasas, ligninasa, lignina peroxidasas y celulasa.
- 4.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la proteína de degradación lignocelulósica es capaz de degradar una sustancia seleccionada del grupo que consiste en lignina, celulosa y hemicelulosa.
- 5.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la proteína de degradación lignocelulósica es una proteína que altera el nivel de glucosa.
- 6.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la proteína de degradación lignocelulósica se selecciona del grupo que consiste en proteínas capaces de producir glucosa y xilosa.
- 7.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la proteína de degradación lignocelulósica se selecciona del grupo que consiste en proteínas que poseen actividad de sacarificación, celulasas, hemicelulasa y xilanasas.
- 8.- La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el corte y empalme de la inteína puede inducirse mediante la exposición a una temperatura dentro de un intervalo de 30 °C a 50 °C y un pH de 6,5 o menor.
- 9.- Un método para fabricar la planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende proporcionar la construcción de expresión; transformar una planta, o una de sus porciones, con la construcción de expresión; y regenerar la planta transgénica a partir de la planta transformada, o de una de sus porciones.

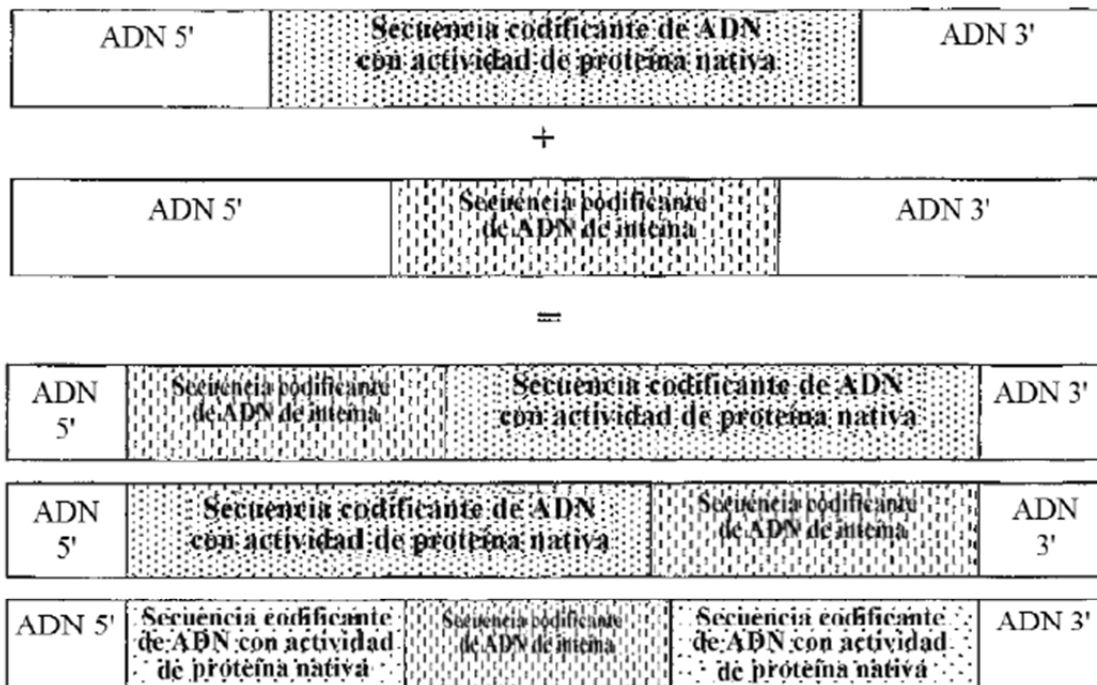


Figura 1

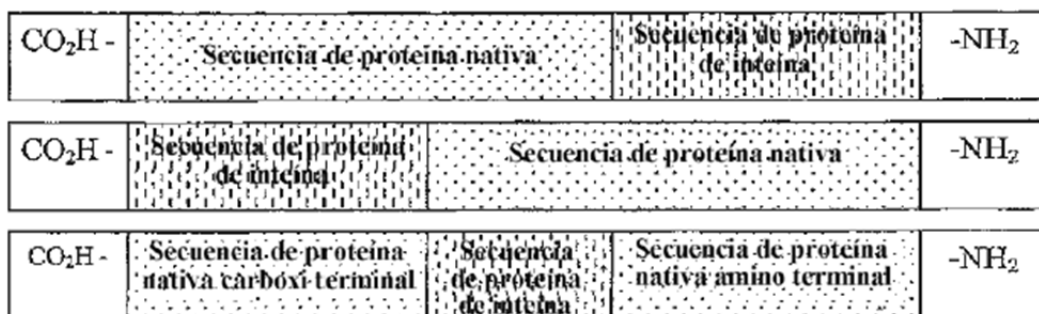


Figura 2

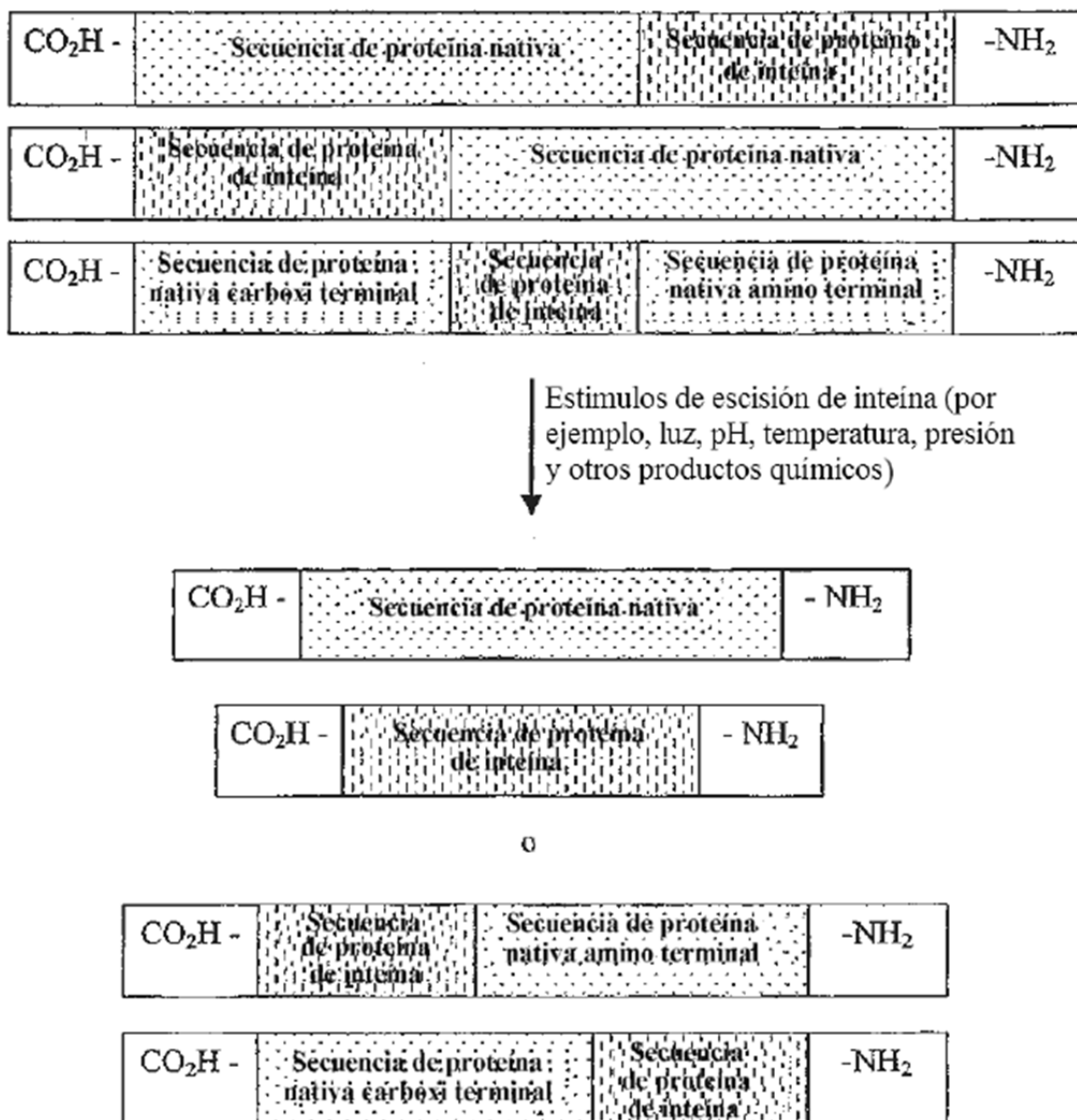


Figura 3