

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 281**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/12 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2010 PCT/GB2010/001537**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11030083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2010 E 10755208 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2475242**

54 Título: **Método para producir biomasa foliar en cultivo**

30 Prioridad:

11.09.2009 US 241613 P

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

24.07.2017

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
52 Princes Gate South Kensington
London SW7 2PG, GB**

72 Inventor/es:

**MICHOUX, FRANCK;
NIXON, PETER y
MCCARTHY, JAMES, GERARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 626 281 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

Método para producir biomasa foliar en cultivo

5 La presente invención se refiere a un método para producir biomasa foliar en cultivo.

La enumeración o discusión de un documento aparentemente publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es un conocimiento general común.

10 La producción de biomasa en cultivo es útil para la producción de polipéptidos modificados genéticamente, para la producción de productos vegetales endógenos, incluyendo medicamentos, polisacáridos, ligninas y lípidos, para la producción de nuevas sustancias simples y complejas que no se encuentran naturalmente en las plantas mediante la modificación de metabolitos, incluyendo nuevas formas de polisacáridos, ligninas, azúcares, compuestos aromáticos y alifáticos y para la captura de dióxido de carbono. La biomasa también se puede utilizar para combustible en algunas circunstancias.

15 El documento WO 00/57690 se refiere a la micropropagación y producción de plantas fitofarmacéuticas a partir de partes vegetales diferenciadas. En particular el documento WO 00/57690 se refiere a la estimulación de pequeños fragmentos de células diferenciadas tomadas de una planta adulta para producir nuevas plántulas que pueden crecer hasta plantas productoras de fitofármacos completamente formadas capaces de experimentar un crecimiento vegetal normal en medios de crecimiento típicos de plantas (por ejemplo, suelo, compost).

20 El documento WO 01/94602 se refiere a un método para regenerar plantas y sus usos para multiplicar y/o transformar plantas usando medios de crecimiento sólidos. Las plantas resultantes de los métodos descritos en el documento WO 01/94602 son plantas viables que pueden crecer en condiciones de crecimiento normal en medios de crecimiento de plantas típicos (por ejemplo, suelo y compost).

25 El documento WO 2008/028115 se refiere a métodos de alto rendimiento para producir un gran número de plantas de maíz transgénico en un corto espacio de tiempo mediante el uso de un sistema de contenedor único para la transgénesis y el crecimiento en una planta viable. Las plantas de maíz producidas son plantas viables con estructuras de raíces, tallos y hojas y que son capaces de experimentar un crecimiento vegetal normal en medios de crecimiento de plantas típicos (por ejemplo, suelo, compost).

30 Gatica-Arias *et al.* 2008 (Electron. J. Biotechnol., 11(1)) se refiere a un protocolo para la regeneración de la planta *Coffea arabica* L. cvs. Caturra y Catuai a través de embriogénesis somática indirecta (ISE). Ese documento también se refiere a un protocolo de transformación genética por medios biolísticos para agregados de callo de Catuai.

35 El uso de sistemas de inmersión temporal en medio cultivo líquido (por ejemplo, biorreactores de inmersión temporal o TIB) es conocido, por ejemplo a partir de Etienne & Berthouly (2002) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 215-231, Hanhineva & Kärenlampi (2007) BMC Biotechnology 7, 11-23 y también de Ducos *et al.* (2007) In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 652-659. Por ejemplo, Hanhineva & Kärenlampi (2007) describen el uso de un TIB para la producción de plantas de fresas transgénicas, en el que las plantas resultantes comprenden un gen exógeno y comprenden tanto la formación de raíces como de brotes, de modo que podrían ser capaces de experimentar un crecimiento vegetal normal, por ejemplo, en tierra o compost.

40 Una de las principales razones por la que los investigadores han elegido plantas para expresar biofarmacéuticos y otras proteínas de alto valor es la formidable posibilidad de aumentar la escala y los muy bajos costos de mantenimiento que están asociados con el crecimiento de las plantas. Sin embargo, el uso de plantas transgénicas tiene sus inconvenientes, con la preocupación pública sobre la transferencia de transgenes a cultivos no transgénicos circundantes y la posibilidad de contaminación de la cadena alimentaria (Fox, 2003).

45 Durante mucho tiempo, se asumió que el genoma del plástido en la mayoría de las especies estaba ausente en el polen y que se heredaba por vía materna (Hagemann, 2004; Zhang *et al.*, 2003; Scott y Wilkinson, 1999). En consecuencia, se consideró que la inserción de genes en el genoma del cloroplasto, o plastoma, para generar plantas transplastómicas, proporcionaba una barrera natural intrínseca al flujo de transgenes mediado por el polen. Sin embargo, varias publicaciones recientes han demostrado que la fuga en la contención del ADN del cloroplasto es más frecuente y extendida de lo que se pensaba originalmente. Por ejemplo, se estimó que la transferencia de ADN de cloroplasto al polen alcanzaba el 0,03 % en *Setaria italica* (cola de zorra) (Wang *et al.*, 2004), de 0,01 a 0,00029 % en tabaco (Ruf *et al.*, 2007; Svab y Maliga, 2007) y 0,0039 % en *Arabidopsis thaliana* (Azhagiri y Maliga, 2007).

50 Otro posible problema es la posibilidad de que con el tiempo el ADN del cloroplasto se transfiera al genoma nuclear (Sheppard *et al.*, 2008), de donde podría pasar a una especie no transgénica cercana, de la misma manera que en el caso de un transformante nuclear clásico. Se detectó una frecuencia de una transferencia de ADN del cloroplasto al ADN nuclear en cada 16.000 granos de polen en el tabaco (Huang *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta el hecho de

que por cada 4.046 m² se pueden cultivar entre 5.000 y 16.000 plantas de tabaco, dependiendo de las especies de tabaco, el riesgo de transferencia de ADN del cloroplasto al núcleo no es despreciable.

5 También se ha planteado otro posible problema relacionado con los casetes de resistencia a los antibióticos, el gen *aadA*, que se utiliza para seleccionar transformantes de cloroplasto, podría transferirse a bacterias del suelo (Monier *et al.*, 2007) y bacterias que se encuentran en el intestino de los insectos alimentadores (Brinkmann y Tebbe, 2007).

10 Para evitar cualquier problema medioambiental que pudiera derivarse de la siembra de semillas transplastómicas en el campo, una solución es producir proteínas recombinantes en cultivos en suspensión de células de plantas cultivadas en condiciones confinadas. De hecho, las suspensiones de células vegetales se han modificado para expresar un gran número de proteínas heterólogas (revisado en Hellwig *et al.*, 2004). Las suspensiones de células vegetales presentan varias ventajas sobre las plantas completas para la producción de proteínas recombinantes, tales como un período de tiempo más corto antes de la cosecha, un crecimiento totalmente controlado e independencia de las condiciones meteorológicas o enfermedades. Las buenas prácticas de fabricación, GMP, 15 actuales basadas en sistemas de producción bacteriana, también pueden aplicarse fácilmente, lo que conduce a una aprobación regulatoria más rápida por la Administración Federal de Medicamentos (FDA) o por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) (revisado en Ma *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Twyman *et al.*, 2003).

20 Al igual que las bacterias, los cultivos en suspensión de células vegetales son baratos de cultivar y mantener. También son intrínsecamente seguros, porque no albergan patógenos humanos ni producen endotoxinas. Las suspensiones de células vegetales pueden mantenerse en medios sintéticos simples, pero pueden sintetizar proteínas multiméricas complejas igual que las células animales. En comparación con las plantas cultivadas en el campo, el rendimiento de las células vegetales cultivadas es independiente del clima, la calidad del suelo, la estación y la duración del día. No hay riesgo de contaminación con micotoxinas, herbicidas o pesticidas (Doran, 2000) y hay menos subproductos (por ejemplo, fibras, aceites, ceras, compuestos fenólicos). La ventaja más importante de los cultivos en suspensión de células vegetales respecto a las plantas enteras es quizás que los procedimientos para aislar y purificar el producto son mucho más sencillos (Fischer *et al.*, 1999).

30 Sin embargo, los principales inconvenientes de los cultivos en suspensión de células vegetales son el lento crecimiento y los usualmente bajos rendimientos de la proteína recombinante producida por transformación nuclear (Hellwig *et al.*, 2004). Otra debilidad es el hecho de que la productividad de los cultivos de células vegetales puede variar considerablemente, variando generalmente los niveles de proteína recombinante de 0,0064 % a 4 % de proteína soluble total (TSP), aunque en casos excepcionales se puede alcanzar hasta 20 % de TSP Huang *et al.*, 35 2001).

En general, la transformación del cloroplasto produce mejores resultados de la proteína recombinante que la transformación nuclear clásica. Por ejemplo, la subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli* se ha expresado a través de la transformación tanto nuclear como plastidial en tabaco. El rendimiento resultante fue 40 veces mayor cuando el gen de la enterotoxina se insertaba en el genoma del plástido (Kang *et al.*, 2003). De manera similar, cuando el antígeno de la toxina B del cólera (CTB) se expresaba a partir de ADN nuclear y de plástido, la producción de antígeno en el cloroplasto de tabaco era 410 veces mayor que en el núcleo (Daniell *et al.*, 2001). Incluso si la transformación de cloroplasto parece ser superior para la sobreexpresión de algunas proteínas, solo se ha publicado un informe sobre la posible producción de GFP recombinante en suspensiones de células vegetales superiores transplastómicas (Langbecker *et al.*, 2004). Este estudio describió la transformación de plástidos de cultivos de células de plantas de tabaco de crecimiento en oscuridad, pero no se realizó ninguna estimación del potencial de expresión.

50 En el trabajo descrito en los Ejemplos, se han investigado los niveles de expresión de una proteína recombinante codificada por plástido, en este caso una variante de la Proteína Fluorescente Verde GFP + (Scholz *et al.*, 2000) en tejidos foliares, callos y suspensiones celulares cultivadas en diversas condiciones. Los resultados indican que la expresión en cultivos en suspensión celular es una ruta factible para la expresión de alto nivel y contenida de una proteína extraña en el cloroplasto, aunque los niveles de expresión son mucho menores que en las hojas de las plantas. También se describe el desarrollo de un nuevo sistema de expresión, basado en biorreactores de inmersión temporal, que es capaz de producir niveles extremadamente altos de proteína recombinante a partir de cultivos en suspensión de células y capaz de producir altos niveles de biomasa foliar a partir de células vegetales indiferenciadas.

60 La invención está definida por las reivindicaciones. Un primer aspecto de la invención proporciona un método para producir biomasa foliar a partir de células vegetales indiferenciadas, comprendiendo el método proporcionar células vegetales indiferenciadas, ponerlas en contacto con un agente que promueve la diferenciación de las células en tejido foliar y cultivar las células en un sistema inmersión temporal en medio de cultivo líquido.

65 Por "células vegetales indiferenciadas" se incluye el significado de que las células no muestran sustancialmente signos de diferenciación en ningún tejido vegetal particular tal como brote o hoja y que permanecerán en ese estado durante al menos un mes en condiciones en las que no está presente ningún agente que induce la diferenciación de

las células indiferenciadas, en particular no debe haber ningún agente que induzca la diferenciación de las células indiferenciadas en brotes. Las células indiferenciadas pueden ser transgénicas o no transgénicas.

5 Generalmente, las células indiferenciadas pueden derivarse de un callo permanente o material de callo. Un callo permanente es un cultivo celular de células vegetales indiferenciadas. Estas células de callo permanentes permanecen en una forma indiferenciada durante al menos un mes.

10 También pueden derivarse células indiferenciadas *in vitro* a partir de material vegetal diferenciado, como hojas, tallos, flores, semillas o raíces, los cuales se cortan y se ponen en contacto con ciertas hormonas vegetales, como las auxinas.

15 Cuando este material vegetal ha estado en contacto con las hormonas, se formarán callos en algunas áreas del material vegetal. Los callos que son inducidos por las hormonas en material vegetal diferenciado no se consideran un callo permanente.

La etapa de proporcionar las células indiferenciadas donde la planta no es una planta transgénica comprende:

20 poner las partes cortadas de una planta (material vegetal) en contacto con hormonas vegetales, las hormonas vegetales generarán callos en el borde de estas partes cortadas;

subcultivar a continuación el callo como un callo y mantener sin ninguna selección.

El material vegetal cortado puede ser todo o parte de una raíz, hoja, tallo, flor o semilla.

25 La etapa de proporcionar las células indiferenciadas donde la planta es una planta transplastómica comprende:

introducir la molécula de ácido nucleico transgénico en un cloroplasto de una célula vegetal mediante un método de recombinación homóloga dirigida al ADN del cloroplasto.

30 inducir la célula vegetal que contiene la molécula de ácido nucleico transgénico para formar un callo de células indiferenciadas y

propagar el callo en condiciones efectivas para lograr la homoplastomía.

35 El callo de la presente invención es un callo permanente, que se ha cultivado y mantenido durante al menos un mes como células indiferenciadas

40 Preferiblemente, las únicas células que están presentes cuando se pone en contacto con el agente son células indiferenciadas. Generalmente, al menos el 90 % o el 95 %, o el 99 %, o el 99,9 %, o el 99,99 % de las células presentes al ponerse en contacto con el agente son células indiferenciadas.

45 Preferiblemente, sustancialmente todo el material de biomasa foliar y de tipo foliar se produce tras la diferenciación de las células indiferenciadas después del contacto con el agente. Generalmente, el material vegetal producido tras el tratamiento de las células indiferenciadas con el agente debe ser al menos 50 % de biomasa foliar, preferiblemente 70 %, y más preferiblemente mayor que 85 %. Por "biomasa foliar" y "biomasa de tipo foliar" se incluye el significado de que el material vegetal está en forma de hoja o tejido "similar a una hoja". Estos tejidos foliares se distinguen de otros tejidos vegetales por la forma de las partes de tejido, el número de cloroplastos y una significativa actividad fotosintética. Por ejemplo, para cualquier planta dada, el material foliar tiene un mayor número de cloroplastos y cloroplastos en desarrollo, como se contó por análisis microscópico confocal del tejido vegetal y estos cloroplastos tienen una mayor actividad fotosintética (determinación de Fv/Fm con fluorómetro) y un mayor contenido de clorofila (por análisis de pigmentos extraídos por espectrofotometría de absorción) que los cloroplastos en material no foliar, como se detecta por la absorción de dióxido de carbono por el tejido vegetal. Tales métodos de determinación son bien conocidos por el experto en la materia como por ejemplo como se describe en (Baker (2008) Ann. Rev. Plant Biol. 59:89-113).

55 El sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido puede ser cualquier sistema tal como se conoce en la técnica (por ejemplo ver Etienne & Berthouly (2002) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 215-231, Hanhineva & Kärenlampi (2007) BMC Biotechnology 7, 11-23 y también de Ducos et al (2007) In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 652 - 659. Generalmente, los sistemas contienen un sustrato sólido poroso sobre el cual residen las células (por ejemplo, una red o una esponja o espuma) que se sumerge en medio de crecimiento líquido durante cortos períodos de tiempo como se discute más adelante.

Las células vegetales pueden ser células de una monocotiledónea o una dicotiledónea.

65 Las plantas dicotiledóneas adecuadas incluyen cualquiera de tabaco, patata, tomate, judía, soja, zanahoria, yuca o Arabidopsis.

Las plantas monocotiledóneas adecuadas incluyen maíz, centeno, avena, mijo, caña de azúcar, sorgo, maíz, trigo o arroz.

- 5 En una realización preferida, las células vegetales proceden de una planta medicinal en la que el producto principal se produce en las hojas. Se apreciará que el método representa un enfoque ventajoso para obtener dichos medicamentos extrayéndolos de la biomasa foliar.

10 Las plantas medicinales adecuadas incluyen cualquiera de *Atropa sp.*, *Hyoscyamus sp.*, *Datura sp.*, *Papaver sp.*, *Scopolia sp.*, *Digitalis sp.*, *Macuna sp.*, *Taxus sp.*, *Camptotheca sp.*, *Cephalotaxus sp.* o *Catharanthus sp.* Artemisia sp, tal como Artemisia annua. Los medicamentos que pueden derivarse de tales plantas medicinales incluyen, pero no se limitan a, alcaloides de tropano, tales como atropina, escopolamina e hiosciamina y sus precursores y derivados; alcaloides morfínicos, tales como codeína, morfina, tebaina, norsanguinarina, sanguinarina y criptopina y sus precursores y derivados; cardenólidos tales como digoxigenina, digitoxigenina, gitoxigenina, diginatigenina, gitaloxigenina y sus precursores y derivados; L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) y su precursor y derivados; compuestos antitumorales tales como taxol y su precursor y derivados, camptotecina y sus derivados, homoharringtonina, harringtonina, isoharringtonina y cefalotaxina y sus precursores y derivados y alcaloides de la Vinca tales como vinblastina, vincristina, vindolina, catarantina, sus precursores y derivados; fármacos antipalúdicos, como la artemisinina, sus precursores y derivados.

20 Los compuestos medicinales producidos por la biomasa foliar se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas por combinación con excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización preferida adicional, la planta puede ser un cultivo energético. Por plantas energéticas, nos referimos a las especies de plantas utilizadas en la producción de biocombustibles, incluyendo etanol o biodiesel. La presente invención permite una producción continua de biomasa que puede emplearse para una producción continua de biocombustible, independiente de la estación y de las especies de plantas. La biomasa generada puede contener endógenamente niveles relativamente elevados de polisacáridos, para su uso en procesos de producción de etanol basados en la fermentación, o niveles relativamente altos de uno o más lípidos que pueden procesarse adicionalmente para la producción de biodiesel. Estos niveles elevados de compuestos ventajosos también pueden generarse en la biomasa por ingeniería genética. Convenientemente, la planta es cualquiera de *Miscanthus sp.*, *Jatropha sp.*, *Panicum sp.*, sauce, palmera, maíz, yuca o álamo.

35 El agente que promueve la diferenciación de las células en tejido foliar es generalmente una hormona vegetal (fitohormona o sustancia de crecimiento de plantas) y preferiblemente una citoquinina. Las citoquininas son un grupo de sustancias químicas que influyen principalmente en la división celular y la formación de brotes, pero también desempeñan un papel en el retraso de la senescencia celular, son responsables de mediar en el transporte de auxinas a lo largo de la planta y afectan a la longitud internodal y el crecimiento foliar. Las auxinas son compuestos que influyen positivamente en el crecimiento de las células, la formación de los brotes y la iniciación de las raíces.

40 También promueven la producción de otras hormonas y, junto con las citoquininas, controlan el crecimiento de los tallos, raíces y frutos y convierten los tallos en flores.

45 La citoquinina puede ser cualquier citoquinina natural o artificial que pertenezca al tipo de la adenina o al tipo de la fenilurea. Preferiblemente, la citoquinina es cualquiera de adenina, cinetina, zeatina, 6-bencilaminopurina, difenilurea, tidiazurón (TDZ) y sus respectivos derivados que tienen actividad de citoquinina

50 Los agentes pueden promover, inducir y provocar la diferenciación de manera que los brotes crezcan rápidamente, preferiblemente de manera exponencial, a partir de cualquier célula vegetal indiferenciada individual derivada de la suspensión del callo/célula de la invención. Tales brotes se convierten en biomasa foliar o biomasa de tipo foliar.

Preferiblemente, el agente que promueve la diferenciación de las células en tejido foliar es tidiazurón (TDZ).

55 Convenientemente, el agente puede usarse en combinación con otra hormona vegetal, tal como una auxina, tal como las auxinas naturales, ácido 4-cloro-indolacético, ácido fenilacético (PAA), ácido indol-3-butírico y ácido indol-3-acético; o los análogos de auxina sintéticos ácido 1- naftalenoacético (NAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Generalmente, el agente se añade en el medio de cultivo a una concentración de 0,01 a 100 μM . Preferiblemente, la concentración está entre 0,1 y 10 μM .

60 El agente se puede añadir al comienzo o durante la etapa de cultivo de inmersión temporal en medio de cultivo líquido.

65 Se puede seleccionar cualquier régimen de inmersión adecuado, por ejemplo para optimizar la producción de biomasa foliar o para optimizar la concentración de un producto particular en la biomasa foliar, tal como un polipéptido o medicamento de interés. Generalmente, el tiempo de inmersión varía de 1 a 30 minutos cada 2 a 24 horas de cultivo. Preferiblemente, el tiempo de inmersión está entre 1 y 10 minutos cada 2 a 6 horas.

El experto en la materia será capaz de seleccionar fácilmente los parámetros de cultivo de inmersión más apropiados, tales como tiempo, temperatura y medios de crecimiento basados en la especie y origen de la planta con el fin de generar una biomasa específica para un propósito específico de la manera más efectiva, es decir, velocidad, cantidad y calidad apropiadas.

El volumen de líquido en el cultivo de inmersión temporal en medio de cultivo líquido puede ser cualquier volumen conveniente, pero generalmente es de 1 a 10.000 litros. En otra alternativa, el volumen puede estar entre 1 y 5.000 litros, 1 y 1.000 litros, o 1 y 500 litros.

El recipiente que contiene el sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido puede tener cualquier tamaño conveniente, y generalmente es de 1 a 10.000 litros. Como alternativa, el volumen puede estar entre 1 y 5.000 litros, 1 y 1.000 litros o 1 y 500 litros.

En una realización de la invención, las células vegetales no están modificadas genéticamente. Como es bien sabido, las plantas producen endógenamente muchos productos importantes en sus hojas, tales como los medicamentos descritos anteriormente, así como aceites, pigmentos, antioxidantes, productos bioquímicos simples y complejos tales como azúcares (carbohidratos), lípidos, aminoácidos, compuestos aromáticos volátiles y sabor/precursores de sabor.

El material vegetal de interés también puede ser capaz de concentrar, capturar o degradar contaminantes tóxicos en una muestra, tal como en una fuente de agua de alimentación (descontaminación/purificación *in vitro* basada en plantas).

El material vegetal también se puede usar para transformar un compuesto contenido en la solución de reacción temporal en uno o más compuestos diferentes.

En otra realización de la invención, las células vegetales se manipulan genéticamente, por ejemplo para expresar un polipéptido. El polipéptido puede ser cualquier polipéptido de interés, pero preferiblemente es cualquiera de un polipéptido terapéutico, una enzima, un factor de crecimiento, una inmunoglobulina, una hormona, una proteína estructural, una proteína implicada en las respuestas de estrés de una planta, un biofarmacéutico, un péptido, o un antígeno vacunal. Cuando el polipéptido es una enzima, esta puede usarse para alterar el metabolismo del material foliar, permitiendo de este modo la generación de nuevos polímeros y metabolitos. Uno o más polipéptidos también se pueden expresar dentro del material foliar para amplificar la capacidad del tejido foliar para purificar o degradar los contaminantes encontrados en una muestra, tal como una fuente de agua.

La célula vegetal modificada genéticamente (célula vegetal recombinante o transgénica) puede ser (i) una célula vegetal transformada nuclearmente en la que el ácido nucleico exógeno (transgén) reside en el núcleo; (ii) una célula vegetal transplastómica en la que el ácido nucleico exógeno (transgén) reside en un plástido, tal como un cloroplasto; o (iii) una célula vegetal que es a la vez transformada nuclearmente y transplastómica.

Los métodos de fabricación de plantas transformadas nuclearmente y plantas transplastómicas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células vegetales usando bombardeo de partículas, microinyección, electroporación con PEG, transformación mediada por *Agrobacterium*, virus de plantas, etcétera (véase, p. ej. Birch 1997, Maliga 2004, Gleba et al., 2008)

Se prefiere que la planta sea una planta transplastómica.

Las plantas pueden transformarse en una serie de formas reconocidas por la técnica. Los expertos en la materia apreciarán que la elección del método puede depender del tipo de planta elegida para la transformación. Ejemplos de métodos adecuados para transformar células vegetales incluyen microinyección (Crossway *et al.*, *BioTechniques* 4:320-334 (1986)), electroporación (Riggs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602- 5606 (1986), transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchey *et al.*, *Biotechnology* 6:915-921 (1988);), transferencia directa de genes (Paszkowski *et al.*, *EMBO J.* 3:2717-2722 (1984) y aceleración balística de partículas usando dispositivos disponibles en Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin y Dupont, Inc., Wilmington, Delaware (véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, patente US-4.945.050;). La transformación mediada por *Agrobacterium* es generalmente inefectiva para plantas monocotiledóneas para las cuales se prefieren los otros métodos mencionados anteriormente.

Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, una técnica de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN (marcador) que codifica un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a la neomicina para cultivos celulares eucarióticos y genes de resistencia a la tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. En otra alternativa, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se utiliza para co-transformar la célula hospedadora deseada.

El gen marcador puede usarse para identificar transformantes, pero es deseable determinar cuáles de las células contienen moléculas de ADN recombinante y cuáles contienen moléculas de vector auto-ligado. Esto puede conseguirse utilizando un vector de clonación en el que la inserción de un fragmento de ADN destruye la integridad de uno de los genes presentes en la molécula. Por lo tanto, los recombinantes pueden identificarse debido a la pérdida de función de ese gen.

Otro método para identificar células transformadas con éxito implica el crecimiento de las células que resultan de la introducción de una construcción de expresión de la presente invención para producir el polipéptido de la invención. Las células pueden ser cosechadas y lisadas y su contenido de ADN examinado para determinar la presencia del ADN usando un método tal como el descrito por Southern (1975) J. Mol. Biol. 98.503 o Berent *et al.* (1985) Biotech. 3.208. Como alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar utilizando anticuerpos como se describe a continuación.

Además de ensayar directamente la presencia de ADN recombinante, la transformación con éxito puede confirmarse mediante métodos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas con éxito con un vector de expresión producen proteínas que muestran una antigenicidad apropiada. Las muestras de células sospechosas de ser transformadas se recogen y se ensayan para determinar la proteína usando anticuerpos adecuados.

Los expertos en la materia apreciarán que los transformantes estables e inestables (transitorios) pueden producirse mediante técnicas de transformación de plantas. Los transformantes transitorios sólo expresan transitoriamente el producto que comprende el compuesto de la invención codificado por la construcción de ADN. Los sistemas de expresión transitorios pueden ser útiles para estudios de genética molecular así como para algunas aplicaciones comerciales específicas en las que las células transformadas que son responsables de la producción de una proteína valiosa se cosechan poco después de la transformación.

Pueden producirse transformantes estables cuando la secuencia de ADN heteróloga se integra en el genoma del hospedador. Con respecto a las plantas, el ADN heterólogo puede insertarse en uno de los cromosomas o en los genomas de organelos (mitocondria, cloroplasto).

Los expertos en la materia apreciarán que *E. coli* puede usarse como un hospedador intermedio y puede utilizarse en la construcción de diversos plásmidos que comprenden la secuencia codificante usando vectores plasmídicos estándar o modificados. La transformación de la planta podría lograrse usando el ADN plasmídico recuperado de este hospedador intermedio y utilizado para la transformación directa de células, por ejemplo mediante un dispositivo biolístico. Como alternativa, la construcción de ADN quimérico que contiene la secuencia codificante podría ligarse a un vector basado en un plásmido Ti o Ri para la propagación en *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* y posterior transformación en células vegetales mediante transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplos de vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión y vectores lanzadera. Los vectores de clonación incluyen agentes que se utilizan para transportar el fragmento de ADN en un receptor con el fin de producir más de una secuencia de ADN. Los vectores de expresión incluyen agentes que transportan la secuencia de ADN a un huésped y dirigen en este la síntesis de un producto específico, tal como una proteína o transcrito antisentido. Se puede producir un vector de expresión mediante la inserción de la secuencia de ADN codificante en un casete de expresión que contiene un sitio de inserción en el vector. Los vectores lanzadera incluyen un elemento genético que está construido para tener orígenes de replicación para dos huéspedes de manera que pueda ser utilizado para transportar una secuencia extraña a más de un huésped. Por ejemplo, el vector lanzadera puede tener orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*.

Generalmente, el ADN se inserta en un vector en la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede estar enlazado con las secuencias nucleotídicas de control reguladoras de la transcripción y la traducción apropiadas reconocidas por el hospedador deseado, aunque dichos controles están generalmente disponibles en el vector. Los elementos reguladores pueden derivarse de una planta o de una fuente alternativa, incluyendo virus vegetales o el plásmido Ti/Ri de *Agrobacterium*.

El inserto de ADN puede estar operativamente unido a un promotor apropiado, por ejemplo un promotor viral de la planta o un promotor de la planta. Los promotores preferibles incluyen promotores constitutivos, inducibles, temporalmente regulados, regulados por el desarrollo, promotores preferidos por células y/o específicos de células, promotores preferidos por tejidos y/o específicos de tejidos y promotores regulados químicamente. El promotor puede ser también un promotor sintético o artificial construido a partir de combinaciones artificiales de sitios de unión de factores de transcripción.

Los promotores constitutivos incluyen los promotores CaMV 35S y 19S (Fraley *et al.*, Patente US-5.352.605). Los casetes de expresión del promotor descritos por McElroy *et al.*, Mol. Gen. Genet 231, 150-160 (1991) se pueden modificar fácilmente para la expresión de la secuencia codificante y son particularmente adecuados para su uso en hospedadores monocotiledóneos.

Otro promotor constitutivo preferido se deriva de la ubiquitina, que es otro producto génico que se sabe que se acumula en muchos tipos de células. El promotor de la ubiquitina ha sido clonado en varias especies para su uso en plantas transgénicas (p. ej., Binet *et al.*, Plant Science 79, 87-94 (1991).

5 Los promotores inducibles incluyen promotores que son sensibles a estímulos ambientales abióticos y bióticos. Los estímulos ambientales abióticos incluyen luz, temperatura y disponibilidad de agua. Los estímulos ambientales bióticos incluyen patógenos (incluyendo promotores inducidos por virus, inducidos por bacterias, inducidos por hongos, inducidos por insectos e inducidos por nematodos), interacciones con simbiontes y herbívoros. Los promotores también pueden ser sensibles al movimiento, al tacto, al daño tisular ya las fitohormonas (incluyendo ácido abscísico, citoquininas, auxinas, giberelinas, etileno, brassinosteroides y péptidos tales como sistemina y los factores de nodulación).

15 Los promotores regulados temporalmente incluyen promotores regulados por los ritmos circadianos, así como aquellos que responden a mecanismos no circadianos de mantenimiento del tiempo. Los promotores regulados por el desarrollo incluyen promotores específicos de tejidos y específicos del tipo celular para órganos y otras estructuras, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores, semillas, embriones, polen y óvulos.

20 Los promotores específicos de tejidos o preferidos de tejidos útiles para la expresión de la secuencia codificante en plantas, particularmente maíz y remolacha azucarera, son aquellos que dirigen la expresión en la raíz, la médula, la hoja o el polen. Ejemplos son el promotor TUB1 del gen de la β -tubulina de *Arabidopsis thaliana* (Snustad *et al.*, Plant Cell 4, 549, 1992), la región del promotor PsMT_A del gen similar a la metalotionina de *Pisum sativum* (Evans *et al.*, FEBS Letters 262, 29, 1990), los promotores RPL16A y ARSK1 de *A. thaliana* y otros promotores divulgados en el documento WO 97/20057 y WO 93/07278. Además, los promotores inducibles químicamente son útiles para dirigir la expresión y también son preferidos (véase el documento WO 95/19443).

25 Particularmente preferido es el promotor 16S rRNA, psbA y rbcL.

30 Además de los promotores, se pueden incorporar diversos terminadores transcripcionales en las construcciones de ADN de la presente invención. Los terminadores transcripcionales son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén y de su poliadenilación correcta. El terminador transcripcional puede derivarse del mismo gen que el promotor o puede derivarse de un gen diferente. En una realización preferida, la secuencia codificadora está operativamente unida a su secuencia de señal de poliadenilación natural. Los terminadores transcripcionales apropiados y aquellos que se sabe que funcionan en las plantas incluyen el terminador CaMV 35S, el terminador tml, el terminador rbcS E9 del guisante y otros conocidos en la técnica. También están disponibles regiones de terminación convenientes a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, Gene, 56, 125 (1987); Guerinneau *et al.*, Mol. Gen. Genet., 262, 141-144 (1991); Proudfoot, Cell, 64, 671-674 (1991).

40 Además de lo anterior, la construcción de ADN de la presente invención puede comprender cualquier otra secuencia que pueda modular los niveles de expresión. Se ha encontrado que numerosas secuencias mejoran la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional y estas secuencias pueden usarse conjuntamente con una secuencia codificante para aumentar la expresión en plantas transgénicas. Se ha demostrado que diversas secuencias de intrones aumentan la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha descubierto que los intrones del gen Adh1 de maíz aumentan significativamente la expresión del gen de tipo silvestre bajo su promotor afín cuando se introducen en células de maíz (Callis *et al.*, Genes Develop. 1, 1183-1200 (1987)). Las secuencias de intrón se incorporan rutinariamente en vectores de transformación de plantas, generalmente dentro del líder no traducido.

50 Las construcciones también pueden incluir un regulador tal como una señal de localización de cloroplastos, promotores específicos de cloroplastos, homólogos de secuencia específica de cloroplasto para promover la recombinación homóloga, señales de localización nuclear (Lassner *et al.*, Plant Molecular Biology 17, 229-234 (1991)), la secuencia de consenso traslacional de plantas (Joshi, C.P., Nucleic Acids Research 15, 6643-6653 (1987)), un intrón (Luehrsen y Walbot, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93 (1991)), y similares, asociados operativamente con la secuencia de nucleótidos apropiada.

55 Los vectores de transformación de plantas frecuentemente utilizados son vectores de *Agrobacterium*, que suministran el ADN por infección. Otros vectores incluyen vectores balísticos y vectores adecuados para la transformación mediada por ADN. Estos métodos son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, la revisión de C.P. Lichtenstein y S. L. Fuller, "Vectors for the genetic engineering of plants", Genetic Engineering, ed. P. W. J. Rigby, vol. 6, 104-171 (Academic Press Ltd. 1987).

60 El método del primer aspecto de la invención se puede usar para capturar dióxido de carbono. Se puede utilizar aire para esto, aunque se prefiere que el aire se enriquezca con dióxido de carbono, por ejemplo puede contener hasta 10 % de dióxido de carbono. Además, para permitir una captura más eficaz del dióxido de carbono, se permitirá una producción adicional de biomasa en virtud de que el carbono adicional se pone a disposición de las células vegetales.

La captura de dióxido de carbono puede lograrse proporcionando aire que contiene dióxido de carbono al biorreactor de inmersión temporal. La fuente de dióxido de carbono puede ser de cualquier fuente incluyendo dióxido de carbono atmosférico, un recipiente de dióxido de carbono, el gas de escape de una planta de energía o el gas de escape de una cámara de combustión y/o de fermentación.

5 La concentración de dióxido de carbono puede controlarse ventajosamente para regular el pH del medio de crecimiento y el crecimiento de la biomasa foliar en el biorreactor de inmersión temporal.

10 Los biocombustibles pueden producirse por un método que comprende las etapas de: cultivar la biomasa foliar en los biorreactores de inmersión temporal descritos anteriormente, por ejemplo siendo el biorreactor uno o más biorreactores de inmersión temporal cerrados; cosechar la biomasa foliar en un proceso de modo continuo, semi-continuo o discontinuo; y convertir los lípidos o carbohidratos de la biomasa foliar en un biocombustible. Los lípidos o carbohidratos pueden ser extraídos de la biomasa foliar antes o como parte del proceso de conversión en biocombustible. Los lípidos o carbohidratos pueden ser secretados alternativamente al medio de cultivo por la biomasa foliar y cosechados del medio de cultivo para su conversión en un biocombustible.

15 Con el fin de mejorar la producción de biocombustible por la biomasa foliar, la biomasa puede ser sometida a un estrés ambiental, o a una combinación de varias tensiones, para aumentar la producción de lípidos y/o carbohidratos. La biomasa foliar también puede ser modificada genéticamente para mejorar la producción y accesibilidad (por ejemplo, promoviendo la secreción en el medio de cultivo) del lípido o carbohidrato que se convertirá en biocombustible.

20 El biodiesel puede producirse a partir de aceites/lípidos por el proceso de transesterificación y es un líquido similar en composición al diesel fósil/mineral. Su nombre químico es éster metílico (o etílico) de ácidos grasos (FAME). Los aceites se mezclan con hidróxido de sodio y metanol (o etanol) y la reacción química produce biodiesel (FAME) y glicerol.

25 Los compuestos de bioalcohol son alcoholes producidos biológicamente, más comúnmente etanol (bioetanol) y menos comúnmente propanol y butanol y son producidos por la acción de microorganismos y enzimas mediante la fermentación de azúcares, almidones o celulosa.

30 Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para producir un polipéptido en células vegetales *in vitro* que comprende:

35 proporcionar células vegetales indiferenciadas que contienen cloroplastos que portan una molécula de ácido nucleico transgénico que codifica el polipéptido, en las que las células vegetales muestran homoplastomía y

40 propagar las células de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención para producir biomasa foliar que contiene el polipéptido.

En otras palabras, las células se propagan por un método que comprende proporcionar células de plantas indiferenciadas, ponerlas en contacto con un agente que promueve la diferenciación de las células en tejido foliar y cultivar las células en un sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido.

45 Las moléculas de ácido nucleico transgénico pueden introducirse en cloroplastos utilizando los métodos descritos anteriormente y en los Ejemplos.

50 Por homoplastomía se entiende la situación en la que se transforman la mayoría o todas las copias múltiples del ADN del cloroplasto en cada cloroplasto de una célula vegetal. La homoplastomía se consigue subcultivando el material transplastómico varias veces, en medios que contienen un agente selectivo. El agente selectivo está asociado con un marcador seleccionable usado en la construcción de transformación, y puede ser cualquier marcador seleccionable apropiado, por ejemplo un gen de resistencia a antibióticos, tal como espectinomicina o kanamicina.

55 La consecución de la homoplastomía se verifica de forma convencional mediante transferencia de Southern.

La etapa de proporcionar las células indiferenciadas donde la planta no es una planta transgénica comprende:

60 poner las partes cortadas de una planta (material vegetal) en contacto con hormonas vegetales, las hormonas vegetales generarán callos en el borde de estas partes cortadas;

subcultivar a continuación el callo como un callo y mantener sin ninguna selección.

65 El material vegetal cortado puede ser todo o parte de una raíz, hoja, tallo, flor o semilla.

La etapa de proporcionar las células indiferenciadas donde la planta es una planta transplastómica comprende:

introducir la molécula de ácido nucleico transgénico en un cloroplasto de una célula vegetal mediante un método de recombinación homóloga dirigida al ADN del cloroplasto.

inducir la célula vegetal que contiene la molécula de ácido nucleico transgénico para formar un callo de células indiferenciadas y

propagar el callo en condiciones efectivas para lograr la homoplastomía.

La construcción transgénica debe contener al menos dos secuencias de ácido nucleico similares (por ejemplo, con una identidad superior al 85 %) al ADN de cloroplasto objetivo para conseguir una recombinación homóloga (los llamados bordes derecho e izquierdo); un gen marcador seleccionable y un péptido codificado o secuencia polipeptídica.

cuanto al uso de células indiferenciadas transplastómicas, la homoplastomía se logra utilizando la selección de antibióticos, por ejemplo la selección con, estreptomicina espectinomina o kanamicina.

La homoplastomía del callo se puede conseguir por diversos métodos bien conocidos por el experto en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a:

(i) el ácido nucleico es introducido en el ADN del cloroplasto de una hoja, y una planta es regenerada (cultivada), esta planta será subcultivada (cortada, colocada sobre un medio selectivo para regenerar los brotes de las partes de la hoja) al menos 2 veces para alcanzar la homoplastomía. Cuando se ha detectado homoplastomía, por ejemplo mediante transferencia Southern, la planta seleccionada se transfiere a un nuevo medio para producir raíces y finalmente al suelo hasta que produce flores y semillas. Las semillas son luego sembradas en un medio selectivo y los brotes que se originan se utilizan para generar callos.

(ii) el método de (i) anterior pero sin transferir la planta al suelo y la floración. Tan pronto como se ha alcanzado la homoplastomía, las hojas de la planta se utilizan para generar los callos.

(iii) el ácido nucleico se introduce en el ADN del cloroplasto de una hoja y, a medida que aparece la primera hoja, se induce un callo sobre medios selectivos (este material vegetal es heteroplastómico porque contiene una mezcla de ADN de cloroplasto transformado y no transformado, lo cual puede verificarse mediante transferencia Southern) y el callo es subcultivado como callos en medios selectivos hasta que posteriormente alcanza la homoplastomía.

(iv) el ácido nucleico se introduce en el ADN del cloroplasto de células indiferenciadas y los callos transplastómicos se subcultivan como callos en medios selectivos hasta alcanzar la homoplastomía.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico comprende un gen marcador seleccionable. Generalmente, el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibióticos tal como *aadA*, *nptII*, *AphVI*.

Generalmente, la molécula de ácido nucleico se inserta en un vector o un fragmento de PCR.

Generalmente, el vector es un plásmido, y generalmente puede propagarse en *Escherichia coli*, células de levadura, insecto o mamífero. Preferiblemente, el plásmido es un plásmido de transformación de cloroplasto.

Se prefiere que la expresión del polipéptido sea controlada por un fuerte promotor específico del cloroplasto. Los promotores adecuados incluyen un promotor del ARNr 16S, un promotor *psbA* y un promotor *rbcl*.

Los métodos de transformación de células vegetales y cloroplastos son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen métodos transgénicos como se ha descrito anteriormente y como se describe en Sambrook and Russell (2001), *Molecular Cloning, A laboratory manual*; Grierson and Covey (1988) *Plant molecular biology* y Watson *et al.*, (1997) *Recombinant DNA*.

La cantidad de luz disponible y/o la cantidad de sacarosa disponible en el medio de crecimiento puede influir en la producción del polipéptido. Los medios y condiciones de crecimiento que incluyen la mezcla de gases (por ejemplo, concentración de dióxido de carbono) pueden ser fácilmente optimizados por un experto en la materia para la producción de cada polipéptido específico basado en el material vegetal que se está utilizando y la biomasa que se requiere producir.

El método del segundo aspecto de la invención incluye preferiblemente incluye la etapa adicional de obtener el polipéptido a partir de la biomasa foliar. También se divulga en la presente invención un polipéptido así obtenido por el método del segundo aspecto de la invención. Convenientemente, el polipéptido se obtiene triturando el tejido foliar para producir un extracto de tejido y aislar el polipéptido del extracto de tejido.

Convenientemente, el polipéptido se purifica a partir del extracto de tejido utilizando al menos uno de filtración, HPLC, extracción de resina de intercambio iónico, extracción de resina de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad o separación de fase aceite-agua.

5 El polipéptido puede comprender una etiqueta para su uso en la purificación del polipéptido. La etiqueta puede ser una etiqueta escindible o no escindible, tal como cualquiera de una etiqueta GST, biotina, 6His, Strep, HA o myc.

También se divulga en la presente invención la biomasa foliar obtenida por el método del primer aspecto de la invención.

10 El polipéptido obtenido a partir del método puede ser cualquiera de un polipéptido terapéutico, una enzima, un factor de crecimiento, una inmunoglobulina, una hormona, una proteína estructural, una proteína implicada en respuestas de estrés de una planta, un antígeno biofarmacéutico o de vacuna

15 Un tercer aspecto de la invención proporciona un método para obtener un componente presente en la biomasa foliar, comprendiendo el método la producción de biomasa foliar de acuerdo con el primer aspecto de la invención y obtener el componente a partir de la biomasa foliar. Generalmente, el componente se obtiene en una forma sustancialmente pura y por lo tanto el método puede comprender la etapa adicional de purificar el componente. La forma sustancialmente pura contiene generalmente > 90 %, o > 95 % o > 99 % del componente.

20 El componente puede obtenerse por su secreción a partir de la biomasa foliar o por extracción de la biomasa foliar, por ejemplo triturando la biomasa foliar para liberar el componente.

25 El componente obtenido puede ser un medicamento, un polipéptido expresado de manera recombinante, un carbohidrato, un lípido, un aceite, un compuesto aromático volátil, un antioxidante, un pigmento, un sabor o precursor de sabor y el componente puede ser endógeno o exógeno.

La invención proporciona además el procesamiento del componente obtenido en un producto adicional, por ejemplo un biocombustible, material alimenticio o medicamento.

30 También se divulga en la presente memoria un sistema para producir un polipéptido en células vegetales *in vitro* que comprende:

- 35 un agente que promueve la diferenciación de células indiferenciadas en tejido foliar y
- una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido, la cual está adaptada para su introducción y expresión en cloroplastos.

40 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para capturar dióxido de carbono, comprendiendo el método llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención.

También se divulga en la presente memoria, pero no se reivindica, un método de purificación de una muestra que comprende exponer la muestra a purificar a la biomasa foliar derivada del método del primer aspecto de la invención.

45 El proceso de purificación puede ser eliminar una o más toxinas.

También se divulga en la presente memoria, pero no se reivindica, un método de fabricación de una composición farmacéutica que comprende formular:

- 50 un componente obtenido por los métodos de los otros aspectos de la invención y un diluyente, excipiente o vehículo portador farmacéuticamente aceptable.

55 Además, también se divulga en la presente memoria un producto farmacéutico que comprende un componente obtenido mediante los métodos de los aspectos de la invención y un diluyente, excipiente o vehículo portador farmacéuticamente aceptable.

60 También se divulga en la presente memoria, pero no se reivindica, un método de fabricación de un biocombustible que comprende la fermentación o transesterificación de un componente obtenido por los métodos de los aspectos de la invención. También se divulga en la presente memoria un biocombustible obtenido mediante el método de fabricación descrito anteriormente.

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes.

65

Figura 1. Análisis de transferencia Southern de la línea transplastómica GFP-6.

(A) Mapa físico del plastoma de *Nicotiana tabacum* petit Havana de tipo silvestre (ADN Wt-pt) y de tabaco transformado (ADN T-pt) en la región de cloroplasto diana. Las flechas debajo de cada mapa indican los tamaños del fragmento de ADN predichos después de la digestión con BgIII del ADN genómico respectivo. La secuencia vectorial se indica en blanco, mientras que la secuencia del plastoma del tabaco está en naranja. (B) Análisis de transferencia Southern después de la digestión del ADN genómico total con BgIII para la línea transgénica GFP-6 (GFP-6) y tabaco de tipo silvestre. El ADN genómico digerido se aplicó sobre un gel de agarosa al 0,7 % (p/v), se transfirió a una membrana de nylon y se probó con fragmento de PCR marcado con Dig correspondiente a la amplificación de la región diana con los cebadores PHK40-F y rps12-out-R (barra negra).

Figura 2. Detección de GFP+ en la línea transplastómica de tabaco GFP-6.

La expresión de GFP fue (A) visualizada en la línea homoplastómica GFP-6 (GFP-6) bajo luz UV y visible junto con la planta de tabaco de tipo silvestre (wt) control. (B) Electroforesis de proteínas de proteínas solubles de las líneas GFP-6 y Wt. Se cargaron 5 µg de extracto de proteína soluble total de cada planta en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % (p/v) junto con marcador de proteína preteñido (New England Biolabs, Reino Unido) y la separación de proteínas se visualizó mediante tinción con plata. La GFP se detectó específicamente mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-GFP específico. También se indica la migración de los marcadores preteñidos.

Figura 3. Expresión de GFP+ en diferentes tejidos transplastómicos de tabaco.

Se generaron extractos de proteína soluble total de callos, suspensiones celulares y hojas de GFP-6 y tabaco de tipo silvestre. Para las suspensiones de callos y células, se cargaron 5 µg de proteína soluble total por carril en un gel SDS-PAGE al 12,5 % (p/v), mientras que para los extractos de hojas solo se cargó 1 µg. (A) corresponde al gel teñido con plata, mientras que (B) representa la transferencia Western correspondiente usando un anticuerpo anti-GFP. Los patrones de GFP se adquirieron en Roche Life Science, Reino Unido y el marcador proteico preteñido de New England Biolabs, Reino Unido. El tamaño de la escala de las proteínas marcadoras está en kDa. Wt significa *Nicotiana tabacum* Petit Havana y *E. coli* corresponde a la extracción de proteínas de una cepa KRX de *E. coli* transformada con pFMGFP.

Figura 4. Crecimiento de callos transplastómicos GFP-6 en diferentes condiciones.

Se tomaron fotos de callos homoplastómicos GFP-6 después de 4 semanas de crecimiento a 25 °C. Las placas (A, B, C y D) se cultivaron con 16/8 h de luz con una intensidad similar a la de las plántulas de tabaco y (E, F, G y H) se cultivaron en la oscuridad. Solo A, B, E y F contenían 3 % (p/v) de sacarosa en los medios. Todos los medios contenían 500 mg/l de espectinomicina y 500 mg/l de estreptomycin. La emisión de fluorescencia se detectó a 520 nm tras la excitación a 490 nm utilizando un microscopio invertido Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Goettingen, Alemania) junto con el software Axiovision (Versión 3.0). La exposición fluorescente fue de 30 ms, 100 ms y 600 ms para A, D y E, H respectivamente. El aumento del microscopio fue el mismo que en A, D, E y H a 40x.

Figura 5. Detección de GFP+ en callos GFP-6 cultivados en diferentes condiciones.

La proteína soluble total se extrajo de callos cultivados en luz (L) u oscuridad (D), así como de tipo silvestre (Wt) cultivados en luz y azúcar. La presencia de sacarosa en los medios se indica mediante (+) mientras que los medios sin sacarosa se describen con (-). Se cargaron 5 µg de proteína soluble total de los callos respectivos en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % (p/v) (L-, L+, D+, D-, wt) y se detectó el contenido de proteína total (A) mediante tinción con plata. M representa el marcador de proteína preteñido (New England Biolabs, Reino Unido) y los tamaños correspondientes se indican a la izquierda en kDa. (B) La presencia de GFP+ se detectó específicamente con un anticuerpo anti-GFP. Se añadieron los patrones de GFP (Upstate, EE.UU.) en las cantidades indicadas en nanogramos.

Figura 6. Expresión de GFP+ en la biomasa verde recién formada en un biorreactor de inmersión temporal.

Después de un período de incubación de 6 semanas, la biomasa de tabaco de la línea GFP-6 (A) se retiró del biorreactor de inmersión temporal. Las proteínas totales se extrajeron de las hojas recién formadas utilizando el protocolo de extracción en acetona y se cargaron (B) en un gel de SDS-PAGE al 10 % (p/v) junto con el patrón de SDS-PAGE preteñido de intervalo bajo (Bio-Rad Laboratories, Reino Unido). Las proteínas de tipo silvestre (wt) y la línea GFP-6 (GFP-6) se visualizaron con tinción azul de Coomassie. Se analizaron diferentes diluciones de polvo acetónico mediante inmunotransferencia (C) con un anticuerpo anti-GFP y se compararon con una cantidad conocida de proteína GFP (Upstate, EE.UU.).

Figura 7. Detección de GFP durante el protocolo de precipitación en acetona.

Transferencia Western que representa la presencia de GFP en varias muestras de diferentes etapas del protocolo de extracción en acetona. Los gránulos se resuspendieron directamente en el tampón de carga mientras que los lavados se secaron durante la noche en un speedvac (Savant, NY, EE.UU.) antes de la adición del tampón de carga. Se cargaron solamente 5 µl de la muestra de gránulos (P) mientras que se añadieron todos los sobrenadantes de los lavados (W) 1 a 4.

Figura 8. Peso seco y fresco de suspensiones de células de *Nicotiana tabacum* Petit Havana.

Los pesos frescos y secos de las células de tipo silvestre de tabaco se determinaron cada 2 días durante un período de crecimiento de 18 días. El peso seco se midió después de dejar las células de tabaco frescas 24 h a 80 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado.

5 **Ejemplo 1: Producción contenida y de alto nivel de proteína recombinante en cloroplastos de plantas utilizando un biorreactor de inmersión temporal**

Resumen

10 La transformación de cloroplastos es un enfoque prometedor para la producción comercial de proteínas recombinantes en plantas. Sin embargo, la contención de genes sigue siendo un problema para el cultivo a gran escala de plantas transplastómicas en el campo. Aquí hemos evaluado el potencial de utilizar suspensiones de células transplastómicas de tabaco para la producción totalmente contenida de una proteína modelo, una forma modificada de la proteína verde fluorescente (GFP+). En las hojas transplastómicas la expresión de GFP+ alcanzó aproximadamente el 60 % de la proteína soluble total (TSP). La expresión en cultivos en suspensión celular (y callos) fue mucho menor (1,5 % de TSP), pero todavía produjo aproximadamente 7,2 mg por litro de cultivo líquido. Además, se investigaron los diferentes factores que influyen en la producción de GFP + en callos, poniéndose de relieve la importancia de la luz como un insumo. Finalmente, se describe el desarrollo de una nueva plataforma de producción de proteínas en la que se colocaron cultivos en suspensión de células transgénicas en un biorreactor de inmersión temporal en presencia de tiazurón para iniciar la formación de brotes. El rendimiento de GFP+ alcanzó una cifra impresionante de 660 mg por l de biorreactor. Esta nueva plataforma de producción, que combina la rápida generación de cultivos en suspensión de células transplastómicas y el uso de biorreactores de inmersión temporal, es una ruta prometedora para la producción de proteínas recombinantes de bajo costo y totalmente contenida.

Resultados**Generación de brotes de tabaco homoplastómicos que expresan GFP+**

30 El vector que se construyó para expresar GFP+ en cloroplastos de tabaco se deriva de pJST10, el cual se usó para expresar el antígeno TetC en cloroplastos de tabaco (Tregoning *et al.*, 2003). El plásmido pJST10 se dirige a la inserción del casete de expresión y selección entre los genes de cloroplastos de tabaco *rrn16S* y *rps127* (Figura 1A). Después del bombardeo, se produjeron varios brotes resistentes a espectinomicina a partir de 10 bombardeos independientes y la integración de *gfp+* se detectó por análisis de PCR en 4 brotes de los 6 analizados (datos no presentados). Se seleccionó GFP-6 para experimentos adicionales y se sometió a 4 rondas de subcultivo en medios selectivos MS.

40 Para confirmar que se transformaron todos los cloroplastos de la línea GFP-6, se extrajo el ADN genómico total de una hoja de esta planta, se digirió con BgIII y se sometió a análisis de transferencia Southern (Figura 1). Como era de esperar, una sonda correspondiente al sitio de inserción se hibridó con una única banda de 4,5 kb en el ADN de tabaco de tipo silvestre. Por el contrario, se detectó una banda de 7,1 kb en la línea GFP-6 que es consistente con la inserción del gen *gfp+* y marcador seleccionable. La falta de la banda de 4,5 kb en GFP-6 también indicó que GFP-6 fue homoplastómico (Figura 1 B).

Expresión de GFP+ en la línea GFP-6

50 La línea de GFP-6 de tabaco se cultivó en suelo y la expresión de GFP+ se probó exponiendo las plantas a una fuente de luz UV/azul (Figura 2A). Se pudo observar una fuerte fluorescencia verde en GFP-6, pero no en el tipo silvestre, lo que indica que la expresión de GFP+ en GFP-6. Para confirmar la acumulación de GFP, se extrajeron las proteínas solubles totales de las líneas GFP-6 y de tipo silvestre y se separaron en un gel de SDS-PAGE (Figura 2B). Un análisis de inmunotransferencia que utiliza un anticuerpo anti-GFP específico confirmó la acumulación de GFP+ y la falta de productos de descomposición significativos. El análisis de geles teñidos con plata (Figura 2B) y con tinción azul de Coomassie (datos no mostrados) reveló que la GFP+, que migraba a 27 kDa, estaba altamente expresada y era la proteína dominante en el extracto soluble.

Comparación de los niveles de expresión en hojas, callos y suspensiones celulares de la línea de tabaco GFP-6

60 Las semillas T0 obtenidas de la línea GFP-6 se germinaron en placas MS *in vitro* y las hojas jóvenes resultantes se usaron para generar los callos y las suspensiones de células transplastómicas correspondientes. La expresión de GFP+ se evaluó en el estado de callo, en el cultivo en suspensión de células y en hojas de la planta parental GFP-6 por SDS-PAGE (Figura 3A) y análisis de inmunotransferencia semicuantitativo (Figura 3B) usando cantidades conocidas de GFP comercialmente disponibles como patrones.

65 El resultado más sorprendente de esta comparación fue el nivel extremadamente alto de expresión de GFP+ en hojas de tabaco (Figura 3A) en comparación con los callos y las suspensiones celulares. Las inmunotransferencias

indicaron que la expresión de GFP+ en hojas era aproximadamente 60 % de TSP, lo que equivalía a aproximadamente 5 mg/g de peso fresco, mientras que la expresión en callo y suspensiones de células era aproximadamente 1,5 % de TSP (Figura 3B). Después de tener en cuenta el crecimiento de las suspensiones celulares (Figura 8 suplementaria), la tasa de producción de GFP+ en suspensiones de células transplastómicas se estimó en aproximadamente 0,4 mg/U día.

Influencia de la luz y el azúcar en la expresión de GFP en callos

Con el fin de evaluar la importancia de la luz y la sacarosa exógena en la expresión de GFP+, los callos transplastómicos de la línea GFP-6 se cultivaron durante un mes en Medios de inducción de callo (CIM) con o sin luz y con o sin sacarosa (Figura 4), pero en presencia de 500 mg/l de espectinomicina para mantener la selección. Como se observa en la Figura 4, el crecimiento de callos fue promovido significativamente por la adición de sacarosa, independientemente de la intensidad de la luz. Cuando tanto la luz como el azúcar estaban disponibles para los callos transplastómicos, se pudo identificar un gran número de pequeños cloroplastos/plástidos que expresaban GFP+, que estaban dispersos dentro del citosol (Figura 4A). Si a los callos no se suministraba luz o azúcar, la fluorescencia GFP disminuyó y el número de cloroplastos/plástidos disminuyó y se localizó en el centro de la célula (Figura 4D y 4E). No se detectó expresión de GFP en callos crecidos en ausencia de luz y azúcar (Figura 4H).

Los experimentos de inmunotransferencia confirmaron que las células crecidas en oscuridad completa expresaron poca o ninguna GFP, mientras que en presencia de luz, independientemente de la presencia o ausencia de sacarosa, la expresión aumentó (Figura 5).

Cuando se creció en presencia de luz y sacarosa (L+), el nivel de expresión de GFP+ se estimó por inmunotransferencia en aproximadamente del 4 % de TSP (Figura 5). Cuando se normalizó a los pesos frescos y secos de los callos, esto correspondía a un nivel de expresión de GFP+ de hasta 48 µg/g p.f. (peso fresco) o aproximadamente 1 mg/g p.s. (peso seco), respectivamente.

Uso de biorreactores de inmersión temporal para la producción de biomasa transplastómica

Dado que la expresión génica transplastómica parecía ser mayor en el tejido foliar, se buscó desarrollar un método para la producción rápida de tejido foliar a partir de suspensiones de callos/células. En experimentos preliminares, se encontró que la adición de tidiazurón (TDZ), que se sabe que promueve el crecimiento embrionario somático en tabaco (Gill y Saxena, 1993), fue capaz de inducir la formación de brotes a partir de callos GFP-6 cultivados en medio MS sólido (datos no mostrados). Con el fin de aumentar la capacidad de producción, las suspensiones de células transplastómicas de la línea GFP-6 de tabaco se cargaron en un biorreactor de 2 litros y se sumergieron temporalmente en medio MS suplementado con TDZ 0,1 µM. Después de aproximadamente seis semanas, se produjo un gran número de brotes (Figura 6A). Durante los primeros 14 días, no se pudo detectar ningún crecimiento y los brotes solo comenzaron a crecer después de este período. Posiblemente este período de retraso esté relacionado con el tiempo necesario para que las células se rediferencien desde el tejido del callo hasta el tejido foliar en el tabaco de una manera similar al cambio observado entre los callos y los tejidos meristemáticos en *Arabidopsis thaliana* Gordon *et al.*, 2007).

Después de 40 días, la biomasa total se eliminó del biorreactor para su análisis. La inspección del material vegetal reveló la presencia de hojas principalmente sanas con una vitrificación mínima.

Se produjo una cantidad total de aproximadamente 470 g de biomasa de peso fresco en el biorreactor de 2 l. Para evaluar la cantidad de GFP+ producida dentro de esta biomasa, se desarrolló un protocolo de precipitación de proteínas basado en la precipitación de proteínas en acetona. Usando este método, se produjo un polvo, se pesó y se cargó en un gel SDS-PAGE para detectar la GFP+ producida (Figura 6B). Se detectó una banda clara, ausente del tipo silvestre, y con un tamaño de aproximadamente 27 kDa. Para cuantificar la producción de GFP+ dentro de la biomasa transplastómica, se cargaron varias cantidades de polvo acetónico y se estimó que 1 µg de este polvo contenía aproximadamente 150 ng de GFP+ mediante inmunotransferencia (Figura 6C). Esto indicaba que el nivel de expresión alcanzaba aproximadamente 2,8 mg/g de peso fresco.

En el biorreactor, la producción total de GFP alcanzó aproximadamente 660 mg/l a una tasa aproximada de 17 mg/U día de GFP durante el período de crecimiento de 40 días. Este valor es aproximadamente 42 veces mayor que la tasa potencialmente alcanzable con suspensiones celulares de 0,4 mg//día.

Discusión

Cultivos en suspensión de células transplastómicas de tabaco

La mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha en el contexto de transformación de los cloroplastos se ha centrado en las hojas para la expresión de varios genes de interés. Algunos trabajos se han realizado sobre la expresión en tubérculos transplastómicos de patata (Sidorov *et al.*, 1999) y fruto de tomate transplastómico (Ruf *et*

al., 2001) pero los rendimientos de expresión fueron relativamente pobres (0,05 y 0,5 % de TSP, respectivamente). Sin embargo, la siembra de plantas transgénicas, aunque sean transplastómicas, podría ser percibida por una gran parte del público y los posibles problemas ambientales podrían tener un impacto drástico en cualquier desarrollo futuro. Además, hay costos regulatorios muy significativos asociados con cada nuevo lanzamiento en el campo transplastómico. La producción de proteínas recombinantes en cultivos basados en células transplastómicas contenidas superaría muchas de estos problemas y debería reducir significativamente los costos regulatorios debido a la naturaleza altamente contenida de este nuevo sistema de producción.

Para comparar diferentes tipos de sistema de expresión, primero se creó una línea homoplastómica de tabaco que expresaba una variante de la proteína fluorescente verde (GFP+). Se ha demostrado previamente que la GFP es capaz de una alta expresión en cloroplastos en una gama de plantas diferentes incluyendo el tabaco (Khan y Maliga, 1999; Newell *et al.*, 2003), patata (Sidorov *et al.*, 1999) y lechuga (Kanamoto *et al.*, 2006). Los niveles de expresión de GFP descritos aquí, aproximadamente 60 % de TSP en hojas, están en el extremo superior de la expresión y son similares al valor observado para la expresión de GFP en lechuga donde se logró GFP con 36 % de TSP (Kanamoto *et al.*, 2006).

Nuestros resultados mostraron claramente que los niveles de expresión de GFP+ son menos en callos y cultivos en suspensión de células en comparación con las hojas (Figura 3 y 5) con niveles que varían entre 1,5 a 4 % de TSP, lo que es similar a la expresión de GFP en callos de lechuga transplastómicos transitorios de 1 % de TSP (Lelivelt *et al.*, 2005).

La expresión de GFP+ en suspensiones de células transplastómicas alcanzó aproximadamente 1,5 % de TSP, lo que corresponde a 7,2 mg/l a una velocidad de producción de 0,4 mg/U día (Figura 5). Este nivel de expresión podía aumentarse posiblemente mediante la optimización de los medios de cultivo, p. ej., mediante la adición de polivinilpirrolidona y/o gelatina, las cuales han ayudado a mejorar los rendimientos de expresión de proteínas en células vegetales transformadas nuclearmente (Kwon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002). También se demostró que el nivel de GFP+ se podría aumentar hasta aproximadamente 4 % de TSP cuando el contenido de luz y azúcar se optimizan mejor (Figura 5). Si este resultado se extrapola al período de crecimiento de las suspensiones celulares, la producción de GFP+ podría alcanzar aproximadamente 1 mg/U día.

Factores que influyen en la producción de GFP+ en callos transplastómicos

Los niveles de expresión generalmente más bajos en callos transplastómicos y suspensiones de células podrían explicarse directamente por la elección del vector de transformación de cloroplasto y específicamente por el promotor respectivo que dirigió la expresión de GFP+. Prn, el promotor del gen *ARN16S* utilizado en pFMGFP, es similar al promotor *ARN16S* de arroz, cuya actividad disminuyó 7 veces en células embriogénicas de arroz en comparación con su actividad en hojas (Silhavy y Maliga, 1998). El mismo fenómeno podría haber ocurrido aquí ya que los plástidos de la suspensión celular están menos diferenciados que los cloroplastos foliares. Sin embargo, trabajos posteriores tendrán que evaluar los niveles de ARNm de GFP en las hojas y callos para poder diferenciar entre una reducción en los niveles de ARNm o una posible variación en el número de cloroplastos.

La luz parecía ser obviamente indispensable para la expresión significativa de GFP+ (Figura 5), mientras que la sacarosa parecía estar más relacionada con el aumento del crecimiento celular. Sin embargo, estos resultados pueden estar sesgados, ya que a pesar de un período de incubación de 1 mes en la oscuridad, la GFP+ es muy estable y la expresión detectada en callos cultivados en medios suplementados con sacarosa en la oscuridad podría corresponder a la producción de GFP+ residual de las células de tabaco antes de haber sido transferidas a la oscuridad. De hecho, la expresión de GFP, impulsada por el mismo promotor, en microtubérculos de patata alcanzó sólo el 0,05 % de TSP (Sidorov *et al.*, 1999), lo que podría indicar que la línea de base real para la expresión de GFP bajo el promotor *prn* es mucho menor que la observada aquí.

En nuestros experimentos, se observó que los callos y las suspensiones celulares permanecían verdes y poseían un gran número de cloroplastos ampliamente diseminados alrededor de la célula (Figura 4A). GFP+ alcanzó en estas células aproximadamente 4 % de TSP y un nivel tan alto podría indicar que estas células son en realidad suspensiones de células transitorias que no están completamente desdiferenciadas y en las que los plástidos siguen siendo similares a los cloroplastos funcionales.

Producción de biomasa transplastómica en biorreactores de inmersión temporal

La producción de GFP+ en hojas fue muy superior a la de las células indiferenciadas (Figura 3) y, por lo tanto, se hicieron intentos para promover la inducción de brotes a partir de tejido de callo transplastómico. La adición de tiazurón (TDZ) al medio sólido indujo la formación de brotes de callos después de 6 semanas (datos no mostrados). Curiosamente, el crecimiento observado en las cajas magenta no fue lineal, y no se detectó ningún crecimiento particular en las 2 primeras semanas.

Sin embargo, cuando las suspensiones de células transplastómicas se colocaron en condiciones de inmersión temporal en las que el material celular se sometió a sumergirse ocasionalmente en líquido, solo durante períodos

5 cortos utilizando un biorreactor de tipo inmersión temporal, la producción de material “foliar” era eficiente y significativa, siendo la producción final de biomasa extremadamente abundante (Figura 6A). Se observó una fase de retardo similar en el crecimiento de la biomasa tanto para la inducción basada en medios sólidos como para la inducción basada en biorreactores de inmersión temporal en los que no se detectó crecimiento durante las 2 primeras semanas.

10 El material estaba compuesto principalmente de hojas pequeñas sanas y se estimó que el contenido de GFP+ alcanzaba aproximadamente 0,66 g/l (Figura 6C). Estos valores son ligeramente inferiores a la producción observada en células de ovario de hámster chino (CHO) (Wilke y Katzek, 2003), pero son uno de los más altos alcanzados en un sistema basado en plantas. Además, los niveles de expresión se obtuvieron sin ninguna optimización y los desarrollos futuros deberían mejorar la producción y escalabilidad del proceso. Por ejemplo, el intercambio de botellas de vidrio para bolsas desechables casi duplicó la cantidad de embrión somático de café producido mediante inmersión temporal (Ducos *et al.*, 2008), posiblemente debido a una mejor penetración y repartición de la luz. Si se utilizara un sistema similar con los brotes transplastómicos de tabaco, los rendimientos de producción podrían alcanzar más de 1 g/l.

15 El sistema aquí descrito, debidamente escalado, debe ser mucho menos intensivo en mano de obra que la producción de plantas enteras en un invernadero y tampoco requiere instalaciones de contención de invernadero. También ofrece una ruta potencialmente más rápida para la producción de proteína objetivo a partir de tejido transformado ya que las semillas no necesitan ser producidas. De hecho, una vez que se identifica una línea de tabaco homoplastómica, solo se requiere un mes para obtener un cultivo de suspensión celular adecuado para los biorreactores de inmersión temporal, mientras que si se necesitan semillas, se necesitan aproximadamente unos 3 meses (Molina *et al.*, 2004). Una combinación del crecimiento de inmersión temporal de brotes transplastómicos con biorreactores desechables recientemente descritos (Terrier *et al.*, 2007; Ducos *et al.*, 2008) es por lo tanto una ruta prometedora para la producción de bajo costo de productos biofarmacéuticos en plantas.

Procedimientos experimentales

Generación de brotes, callos y suspensiones celulares de tabaco

30 Se cultivaron plántulas, callos y suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* Petit Havana (tabaco) a 25 °C, con un fotoperíodo de 16 horas (aproximadamente 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) con un 30 % de humedad en una incubadora Fi-Totron 600H (Sanyo, Watford, Reino Unido). Las plántulas de tabaco se germinaron en medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y se produjeron callos colocando pequeños trozos de hojas en el medio de inducción de callos (CIM), que es un medio MS suplementado con 1 mg/l de ácido 1-naftalenoacético (NAA) y Kinetina (K) 0,1 mg/l. Las suspensiones celulares se generaron incubando grandes cantidades de callos en medios CIM que carecían del agar bajo una agitación constante de 140 rpm. Todas las hormonas vegetales y los medios se adquirieron de Sigma, St Louis, MO, EE.UU.

Construcción del vector de transformación de cloroplasto

40 El vector de transformación de cloroplasto pFMGFP se creó intercambiando el gen *TeTC* por el gen *gfp+* (Scholz *et al.*, 2000) en el vector de cloroplasto de tabaco previamente caracterizado pJST10 (Tregoning *et al.*, 2003) por doble digestión utilizando sitios de restricción NdeI y XbaI.

Generación de plantas transplastómicas de tabaco

50 La transformación biolística de hojas de tabaco silvestre de 6 semanas de edad con el vector de transformación de cloroplasto de tabaco pFMGFP se realizó en medios RMOP (Svab *et al.*, 1990) con una composición a base de medio MS suplementado con 1 mg/l de tiamina, 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de N6-benciladenosina (BAP) y 0,1 mg/l de ácido 1-naftalenoacético (NAA) usando el dispositivo biolístico PDS1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) con discos de ruptura de 7584,23 kPa. El vector pFMGFP se recubrió con partículas de oro de 550 nm (SeaShell, La Jolla, CA, EE.UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Después del bombardeo, las hojas permanecieron en la oscuridad durante 48 horas antes de que los materiales vegetales se cortaran en trozos pequeños (5 mm x 5 mm) y se colocaron en medio RMOP suplementado con 500 mg/l de diclorhidrato de espectinomicina. Los brotes resistentes a la espectinomicina se subcultivaron en el mismo medio 4 veces.

Análisis de transferencia Southern

60 La integración de vectores en el plastoma de tabaco se evaluó mediante PCR usando un cebador que hibrida al comienzo de *gfp+* y el otro en el plastoma del tabaco fuera de las regiones homólogas del vector pFMGFP (datos no mostrados) y la línea GFP-6 transplastómica se eligió para todos los experimentos posteriores. El estado de la homoplastomía se evaluó por hibridación Southern del ADN genómico total digerido de ambas líneas GFP-6 de tipo silvestre y transplastómico. Se digirieron aproximadamente 7 μg de ADN genómico con BglII y se aplicó sobre un gel de agarosa al 0,7 % (p/v). El gel de ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham, Uppsala, Suecia) durante la noche en tampón 20 x SSC.

La sonda se marcó con DIG durante la noche a 37 °C usando el DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Reino Unido). Se obtuvo una sonda de 3 kb homóloga a la región diana mediante PCR utilizando los cebadores pJST10-F 5' AATTCACCGCCGTATGGCTGACCGGCGA 3' y Rps12-OUT-R 5' TTCATGTTCCAATTGAACACTGTCCATT 3' y ADN genómico de tabaco como molde. El marcaje con sonda y la hibridación se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con una concentración de la sonda final de 25 ng/ml. La detección de señal específica con CSPD proporcionado se detectó mediante una película de rayos X (Amersham, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las directrices del fabricante. Después de la confirmación de la homoplasma por análisis de transferencia Southern, la plántula GFP-6 se transfirió al suelo y se dejó producir semillas. Estas semillas T₀ se germinaron sobre medios MS suplementados con 500 mg/l de espectinomicina y las hojas T₀ jóvenes se utilizaron para la generación de callos y suspensiones celulares.

Extracciones de proteínas

En primer lugar, la extracción total de proteínas solubles se realizó de acuerdo con (Kanamoto *et al.*, 2006). Los materiales vegetales (hojas, callos, suspensiones celulares) se plantaron en un polvo fino con nitrógeno líquido y se mezclaron con tampón de extracción soluble total (HEPES 50 mM pH 7,6, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, polivinilpirrolidona al 2 % y un comprimido de cóctel completo de inhibidores de la proteasa sin EDTA (Roche Products Ltd, Welwyn Garden City, Reino Unido). Las mezclas vegetales se sometieron a vórtice durante 1 minuto y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

El segundo método se basó en un protocolo de extracción de proteínas totales basado en la precipitación en acetona. El material vegetal se plantó en un polvo fino en nitrógeno líquido. Se añadieron 30 ml de tampón de extracción (80 % (v/v) de acetona, ascorbato 5 mM) a 2 g de polvo vegetal o equivalente de hoja y la mezcla se homogeneizó con Ultra-Turrax (IKA, Heidelberg, Alemania) durante 15 s sobre hielo. Las proteínas se sedimentaron mediante una centrifugación a 5.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó 4 veces usando el mismo tampón de extracción y las mismas condiciones de centrifugación. A continuación, el sedimento se resuspendió en acetona pura y se homogeneizó de nuevo. Las proteínas se centrifugaron una vez más a 10.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó 3 veces más en acetona pura. Durante el último lavado, el tampón se dividió en partes alícuotas y se secó usando un Speed-Vac (Savant, Holbrook, NY, EE.UU.) y el polvo residual se denominó polvo acetónico. La presencia de GFP en el sedimento y los diferentes lavados se detectó por análisis de transferencia Western (Figura 7).

Electroforesis y análisis de transferencia Western

Las proteínas de las muestras transplásticas y de tipo silvestre se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 12,5 % (p/v) junto con marcadores de proteína y GFP recombinante disponibles comercialmente (Upstate, Waltham, MA, EE.UU.) con fines de cuantificación. Los geles de proteína se tiñeron directamente con azul de Coomassie o con tinción con plata.

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) ya sea utilizando el sistema mini Trans-Blot® (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) o utilizando el sistema de transferencia en seco iBlot según la recomendación del fabricante (Invitrogen, Reino Unido). Después de la transferencia, se realizó la detección específica de GFP con anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo primario (proporcionado por el Prof. Nixon, Imperial College London, Reino Unido) diluido 1:20.000 mientras que el anticuerpo secundario (inmunoglobulina G anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante, Amersham Uppsala, Suecia) se diluyó 1:10.000. La detección bioquímica se realizó con el kit ECL SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate (Pierce Biotechnology Inc., Reino Unido).

Biorreactores de inmersión temporal

La biomasa del tabaco se generó colocando aproximadamente 7 gramos de suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* Petit Havana en un biorreactor de inmersión temporal de 2 litros (Ducos *et al.*, 2007). Las inmersiones se realizaron durante un período de 40 días con medio MS de 1 l suplementado con tidiazurón 0,1 µM (TDZ, Sigma, Reino Unido) cada tres horas durante 5 min. Adicionalmente, los medios contenían 100 mg/l de espectinomicina para prevenir la contaminación y seleccionar células transplásticas. La concentración de TDZ (tidiazurón) en medios MS fue estimada como óptima a 0,1 µM por investigadores en Nestlé, basada en la inducción sólida de callos en placas de Petri (datos no mostrados). El medio fue impulsado por una bomba de aire en el recipiente de 2 litros durante 3 minutos y se dejó volver a la botella original por gravedad durante 2 minutos más. Las condiciones de luz y la temperatura fueron similares a las de los experimentos de crecimiento de callos y suspensiones celulares.

Microscopio de fluorescencia

Se observaron callos de tabaco transplásticos y suspensiones de células que expresan GFP y que procedían de la línea GFP-6 usando un microscopio invertido Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Goettingen, Alemania) y el software Axiovision (versión 3.0). La excitación y la longitud de onda de emisión se establecieron a 491 nm y 512 nm

respectivamente, óptima para la detección de GFP+ (Scholz *et al.*, 2000). Las exposiciones y el aumento variaron dependiendo del experimento y se indican en cada figura.

Tabla S1. Proporciones entre pesos frescos, secos y polvo acetónico.

Estas proporciones se calcularon para la determinación de una cuantificación robusta de GFP. Los valores representaban un promedio de al menos 4 repeticiones para el peso fresco (p.f.), peso seco (p.s.) y polvo acetónico (polvo). Se cosecharon callos y suspensiones celulares (células) al final de sus respectivas fases de crecimiento y se realizó la medición de las hojas en plántulas jóvenes de 2-3 semanas de edad (con aproximadamente 4 hojas por planta, similar a la biomasa producida en el biorreactor de inmersión temporal).

Tejido	p.s./p.f. (%)	Polvo/p.s. (%)
Hojas	6,6 ± 0,9	28,3 ± 1,1
Células	4,4 ± 0,3	14,1 ± 1,4
Callos	3,6 ± 0,4	12,4 ± 1,3

Referencias

- Azhagiri AK and Maliga P (2007) Exceptional paternal inheritance of plastids in Arabidopsis suggests that low-frequency leakage of plastids via pollen may be universal in plants. *Plant J* 52: 817-823.
- Birch RG (1997) PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:297-326.
- Brinkmann N and Tebbe CC (2007) Leaf-feeding larvae of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) drastically reduce copy numbers of *aadA* antibiotic resistance genes from transplastomic tobacco but maintain intact *aadA* genes in their feces. *Environmental biosafety research* 6: 121-133.
- Daniell H, Lee SB, Panchal T and Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of molecular biology* 311: 1001-1009.
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current opinion in biotechnology* 11: 199-204.
- Ducos J, Labbe G, Lambot C and Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 652-659.
- Ducos J, Terrier B, Courtois D and Pétiard V (2008) Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochemistry Reviews* 7: 607-613.
- Farran I, Rio-Manterola F, Iniguez M, Garate S, Prieto J and Mingo-Castel AM (2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 6: 516-527.
- Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S and Drossard J (1999) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnology and applied biochemistry* 30 (Pt 2): 109-112.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* 7: 152-158.
- Fox JL (2003) Puzzling industry response to ProdiGene fiasco. *Nature biotechnology* 21: 3-4.
- Gill R and Saxena PK (1993) Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports* 12: 154-159.
- Gleba Y, Klimyuk V and Marillonet S (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 18:134-41.
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P and Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development (Cambridge, England)* 134: 3539-3548.
- Hagemann R (2004) The Sexual Inheritance of Plant Organelles, in *Molecular Biology and Biotechnology of Plant*

Organelles pp 93-113.

Halioua E (2006) Status of biomanufacturing in the world. Eurobio conference 2006. www.eurobio2006.com/DocBD/press/pdf/41.pdf (accessed 3/3/09)

Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 22: 1415-1422.

Huang CY, Ayliffe MA and Timmis JN (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422: 72-76.

Huang J, Sutliff TD, Wu L, Nandi S, Bengel K, Terashima M, Ralston AH, Drohan W, Huang N and Rodriguez RL (2001) Expression and purification of functional human alpha-1-Antitrypsin from cultured plant cells. *Biotechnology progress* 17:126-133.

Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A and Tomizawa K (2006) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic research* 15: 205-217.

Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE and Yang MS (2003) Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic research* 12: 683-691.

Khan MS and Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature biotechnology* 17: 910-915.

Kwon TH, Seo JE, Kim J, Lee JH, Jang YS and Yang MS (2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnology and bioengineering* 81: 870-875.

Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL and Staub JM (2004) High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant physiology* 135: 39-46.

Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS and Yang MS (2002) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *Journal of biotechnology* 96: 205-211.

Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH and Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant molecular biology* 58: 763-774.

Ma JK, Drake PM and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews* 4: 794-805.

Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55:289-313.

Molina A, Hervas-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM and Veramendi J (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 2: 141-153.

Monier JM, Bernillon D, Kay E, Faugier A, Rybalka O, Dessaux Y, Simonet P and Vogel TM (2007) Detection of potential transgenic plant DNA recipients among soil bacteria. *Environmental biosafety research* 6: 71-83.

Murashige K and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Newell CA, Birch-Machin I, Hibberd JM and Gray JC (2003) Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. *Transgenic research* 12: 631-634.

Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H and Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature biotechnology* 19: 870-875.

Ruf S, Karcher D and Bock R (2007) Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6998-7002.

Saxby S (1999) Commercial production of monoclonal antibodies. In: *Proceedings of the Production of Monoclonal antibodies Workshop* (Eds. McArdle JE and Lund CJ). <http://altweb.jhsph.edu/topics/mabs/ardf/saxby.htm> (accessed 3/2/09)

- Scholz O, Thiel A, Hillen W and Niederweis M (2000) Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *p6. European journal of biochemistry / FEBS* 267: 1565-1570.
- 5 Scott SE and Wilkinson MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nature biotechnology* 17: 390-392.
- Sheppard AE, Ayliffe MA, Blatch L, Day A, Delaney SK, Khairul-Fahmy N, Li Y, Madesis P, Pryor AJ and Timmis JN (2008) Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco. *Plant physiology* 148: 328-336.
- 10 Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM and Nehra NS (1999) Technical Advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216.
- 15 Silhavy D and Maliga P (1998) Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Current genetics* 34: 67-70.
- Svab Z, Hajdukiewicz P and Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 8526-8530.
- 20 Svab Z and Maliga P (2007) Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7003-7008.
- 25 Terrier B, Courtois D, Henault N, Cuvier A, Bastin M, Aknin A, Dubreuil J and Petiard V (2007) Two new disposable bioreactors for plant cell culture: The wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 96: 914-923.
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G and Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic acids research* 31: 1174-1179.
- 30 Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in biotechnology* 21: 570-578.
- 35 Verma D and Daniell H (2007) Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiology* 145: 1129-1143.
- Wang T, Li Y, Shi Y, Reboud X, Darmency H and Gressel J (2004) Low frequency transmission of a plastid-encoded trait in *Setaria italica*. *Theoretical and applied genetics* 108: 315-320.
- 40 Wilke D and Katzek J (2003) Primary production of biopharmaceuticals in plants - An economically attractive choice? In: *European Biopharmaceutical Review* (Autumn). www.biomitteldeutschland.de/files/pdf/Biopharmaceuticalsinplants.pdf (accessed 3/2/09)
- 45 Zhang Q, Liu Y and Sodmergen (2003) Examination of the Cytoplasmic DNA in Male Reproductive Cells to Determine the Potential for Cytoplasmic Inheritance in 295 Angiosperm Species, in *Plant Cell Physiology* 44: 941-951.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir biomasa foliar a partir de células vegetales indiferenciadas, comprendiendo el método proporcionar células vegetales indiferenciadas, ponerlas en contacto con un agente que promueve la diferenciación de las células en tejido foliar y cultivar las células en suspensión en un sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido y en el que el agente está presente en el medio de cultivo del sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido y en el que el agente es una citoquinina y en el que el agente se añade al medio de cultivo a una concentración de 0,01 a 100 μM y en el que el tiempo de inmersión varía de 1 a 30 minutos cada 2 a 24 horas y en el que el volumen de líquido en el sistema de inmersión temporal en medio de cultivo líquido es de 1 a 10.000 litros.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células vegetales son células de (i) una monocotiledónea seleccionada de maíz, centeno, avena, mijo, caña de azúcar, sorgo, maíz, trigo, arroz, *Miscanthus* sp., *Panicum* sp. o palmera o (ii) una dicotiledóna seleccionada de tabaco, tomate, patata, judía, soja, zanahoria, yuca, *Arabidopsis*, *Atropa* sp., *Hyoscyamus* sp., *Datura* sp., *Papaver* sp., *Scopolia* sp., *Digitalis* sp., *Macuna* sp., 15 *Taxus* sp., *Camptotheca* sp., *Catharanthus* sp., *Artemisia* sp., *Jatropha* sp., sauce o álamo o (iii) *Cephalotaxus* sp.
- 20 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la citoquinina es cualquiera de adenina, cinetina, zeatina, 6-bencilaminopurina, difenilurea o tidiazurón (TDZ).
- 25 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente se usa en combinación con una auxina.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células vegetales no están modificadas genéticamente.
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células vegetales están modificadas genéticamente.
- 35 7. Un método para producir un polipéptido en células vegetales *in vitro* que comprende:
proporcionar células vegetales indiferenciadas que contienen cloroplastos que portan una molécula de ácido nucleico transgénico que codifica el polipéptido, en el que las células vegetales muestran homoplastomía y propagar las células de acuerdo con el método de la reivindicación 1 para producir biomasa foliar que contiene el polipéptido.
- 40 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de proporcionar las células indiferenciadas comprende:
introducir la molécula de ácido nucleico transgénico en un cloroplasto de una célula vegetal;
inducir la célula vegetal que contiene la molécula de ácido nucleico transgénico para formar un callo de células indiferenciadas y
45 propagar el callo en condiciones efectivas para lograr homoplastomía.
- 50 9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que la homoplastomía se logra utilizando selección de antibióticos.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que se controlan la cantidad de luz disponible y/o la cantidad de sacarosa disponible para optimizar la producción del polipéptido.
- 55 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además la obtención del polipéptido a partir de la biomasa foliar.
- 60 12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el polipéptido es cualquiera de un polipéptido terapéutico, una enzima, un factor de crecimiento, una inmunoglobulina, una hormona, una proteína estructural, una proteína implicada en las respuestas al estrés de una planta, un producto biofarmacéutico o un antígeno vacunal.
13. Un método para la obtención de un componente presente en la biomasa foliar, comprendiendo el método producir biomasa foliar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y obtener el componente a partir de la biomasa foliar.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el componente se obtiene mediante su secreción por la biomasa foliar o por extracción a partir de la biomasa foliar.
- 5 15. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en el que el componente es un medicamento, un polipéptido expresado de manera recombinante, un carbohidrato, un lípido, un aceite, un compuesto aromático volátil, un antioxidante, un pigmento, un sabor o un precursor de sabor y en el que el componente puede ser endógeno o exógeno.
- 10 16. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 13 a 15, en el que el componente se procesa para dar un producto adicional.
17. Un método para capturar dióxido de carbono, comprendiendo el método llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1 a 6.

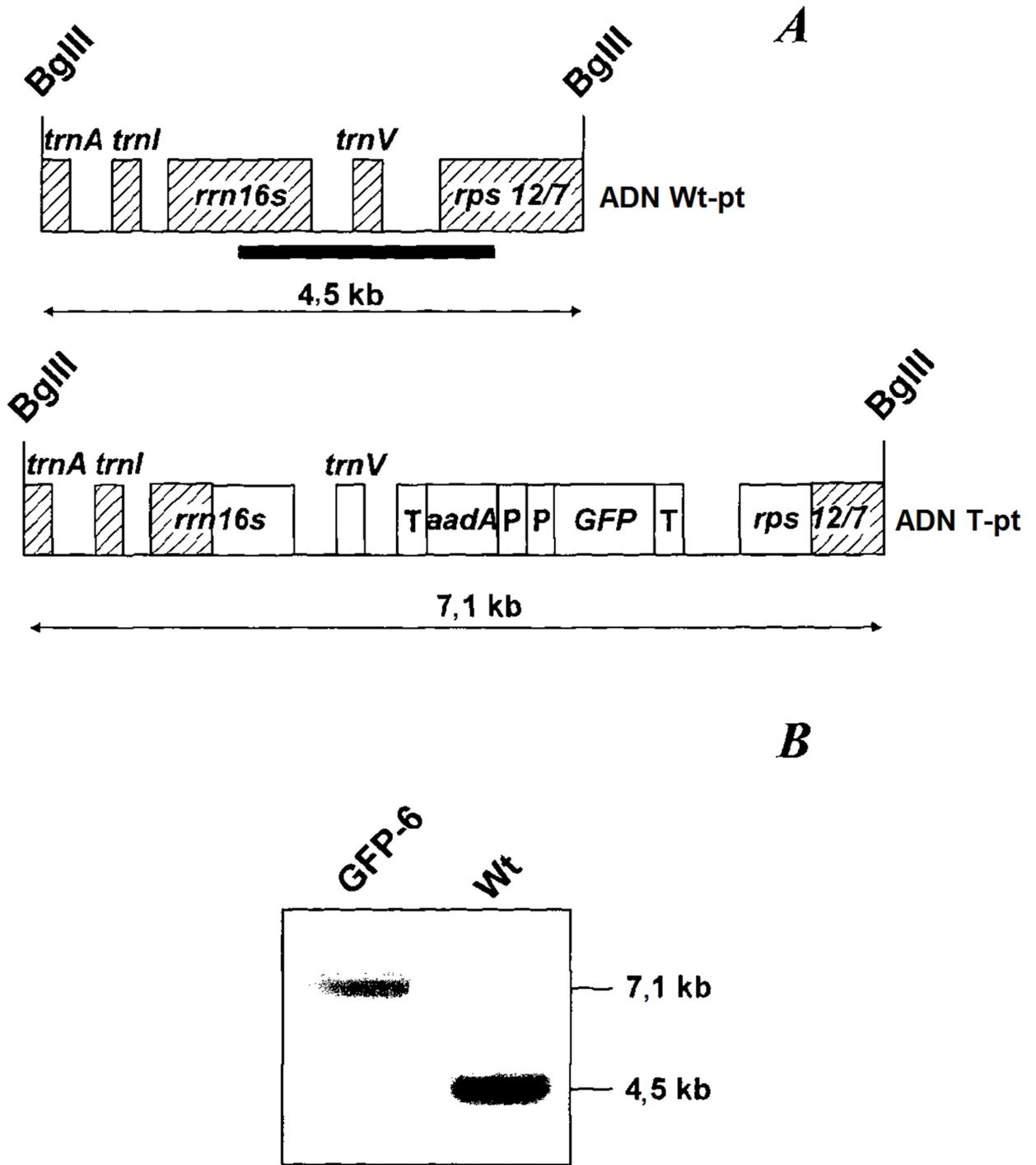


Fig. 1

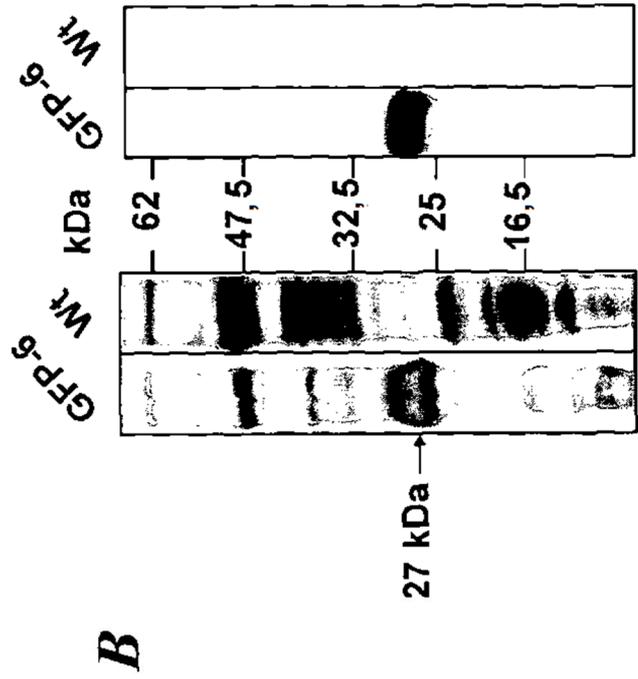
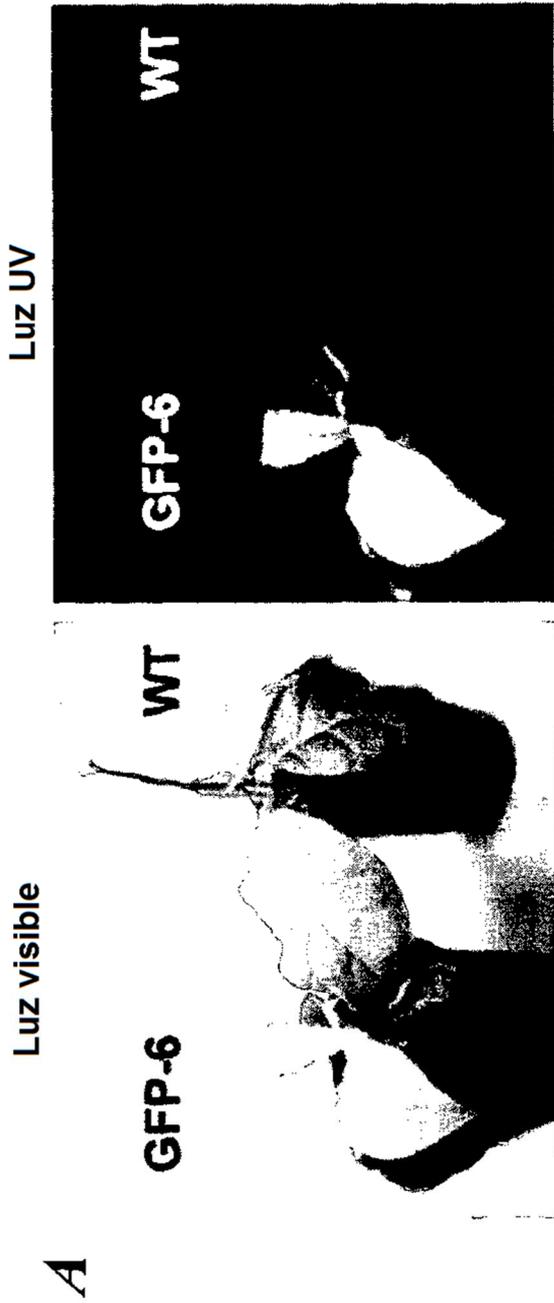
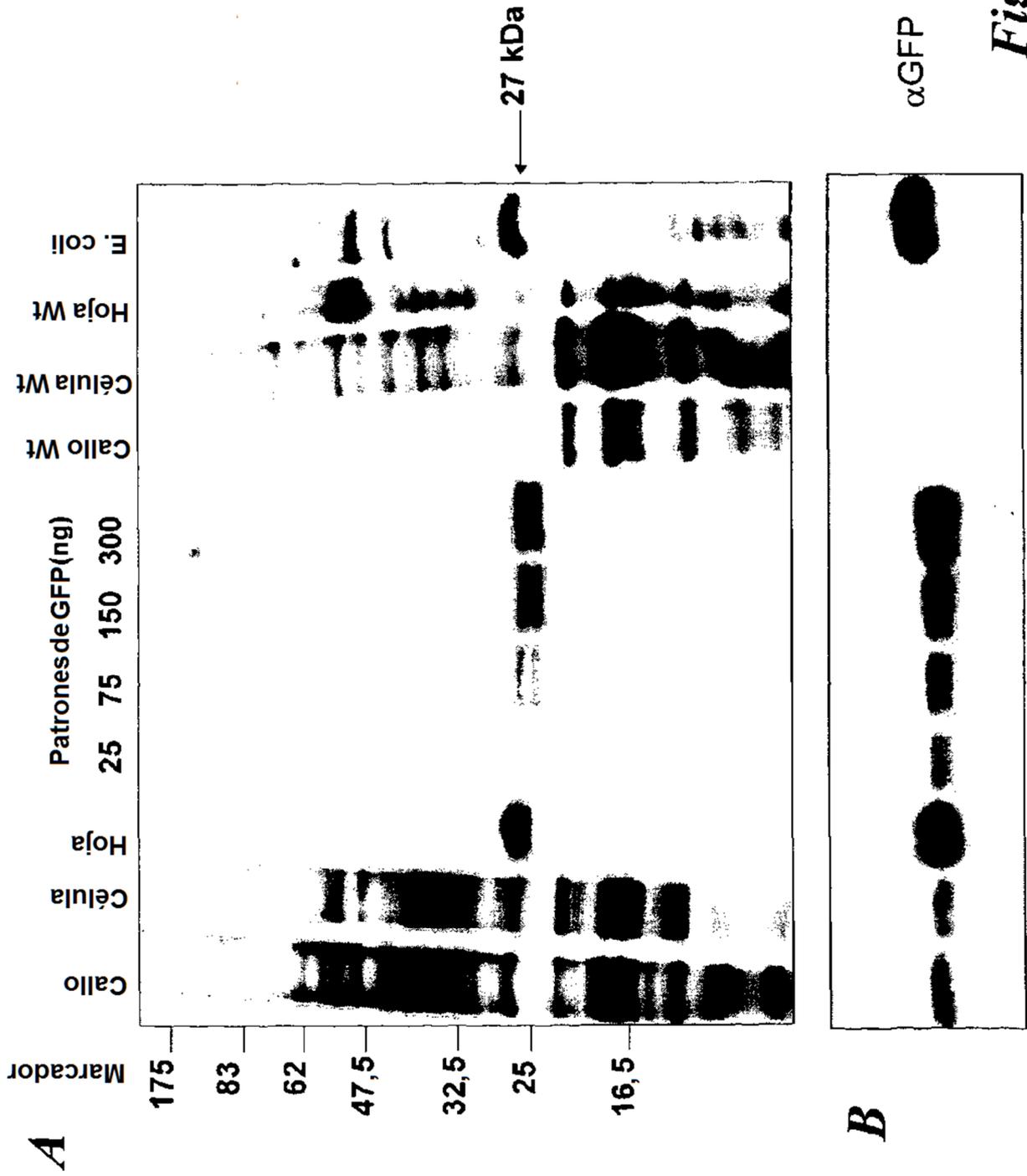


Fig. 2



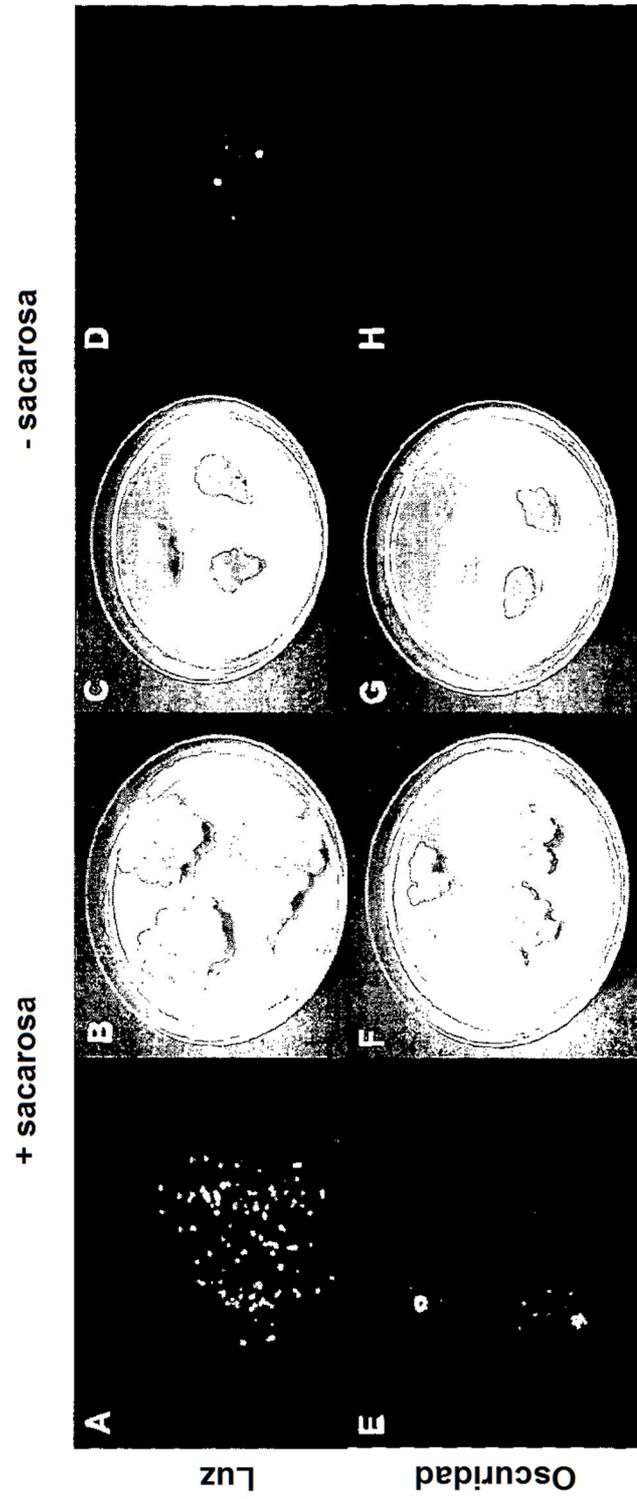


Fig. 4

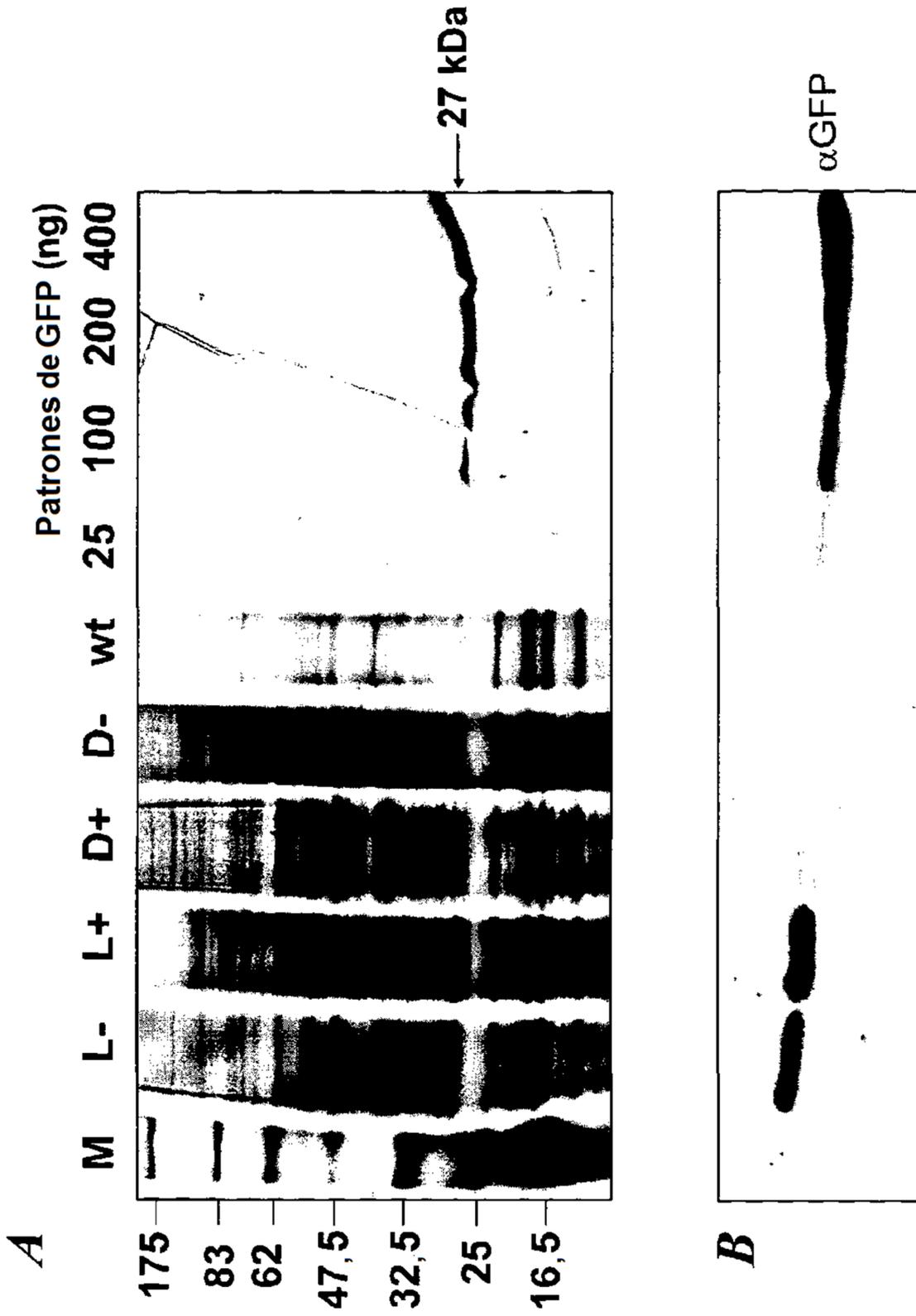


Fig. 5

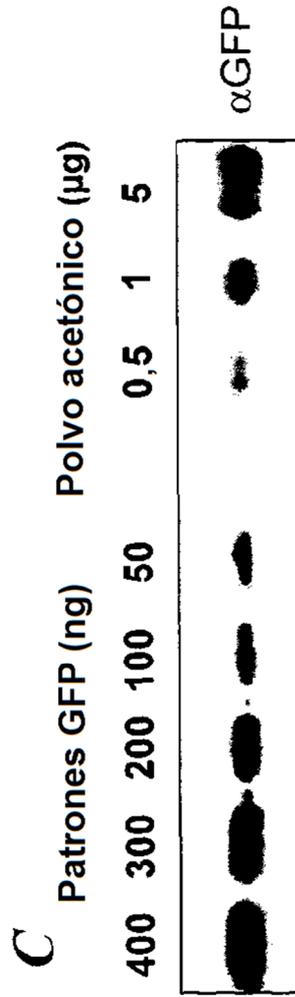
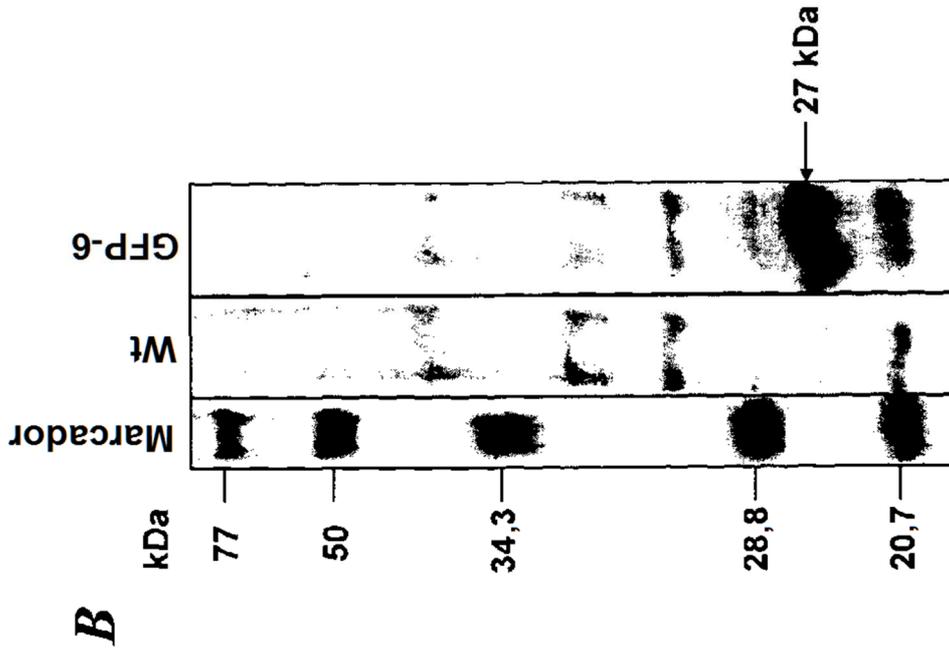


Fig. 6

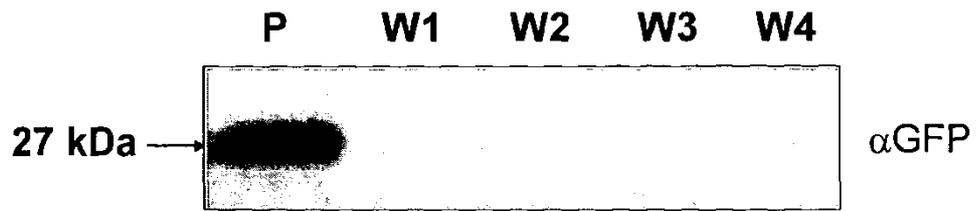


Fig. 7

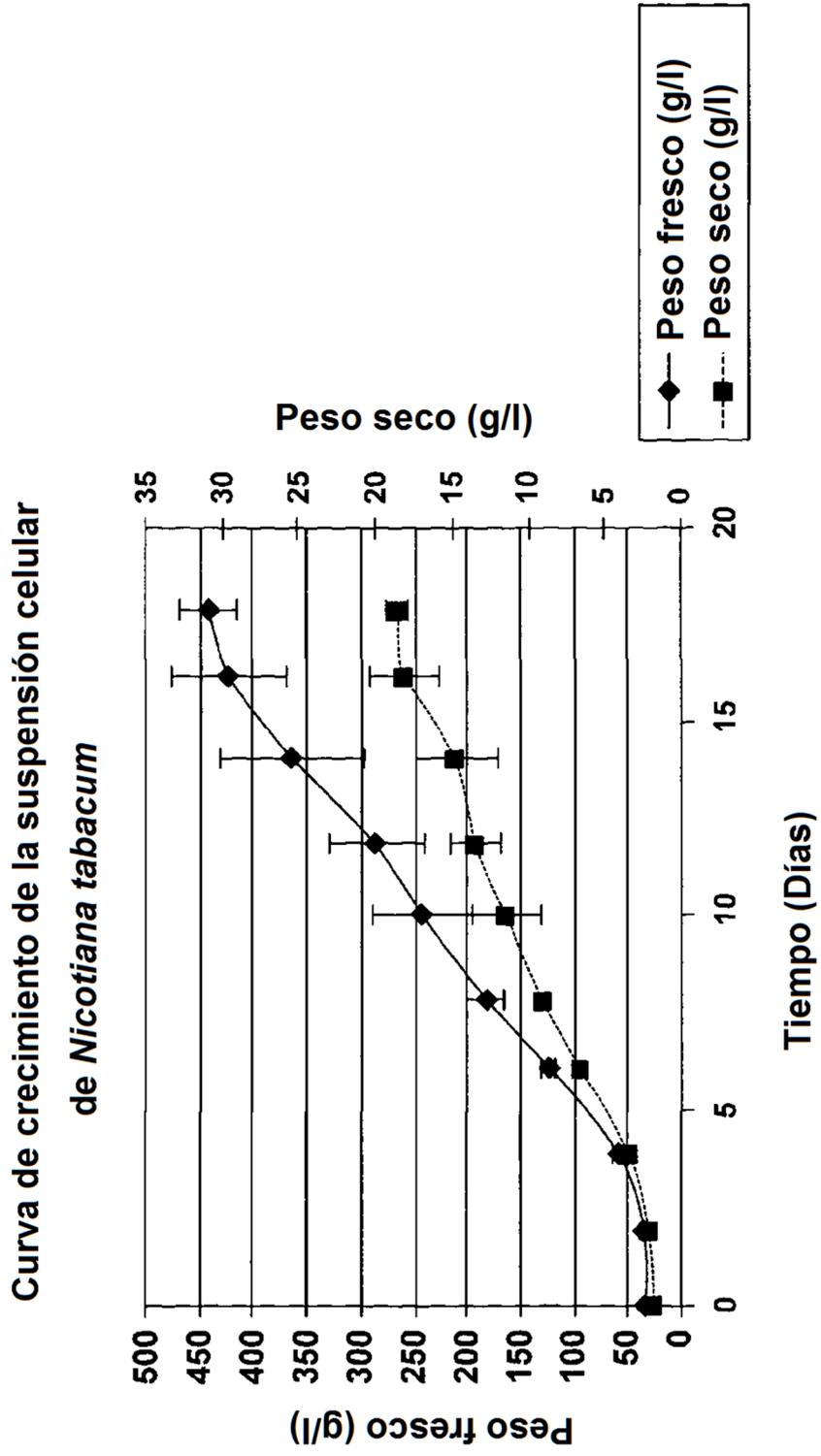


Fig. 8