

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 825**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2012** **PCT/EP2012/050645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12098119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2012** **E 12700481 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2665818**

54 Título: **Expresión de proteínas en plantas**

30 Prioridad:

17.01.2011 EP 11151190

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

17.10.2017

73 Titular/es:

PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. (100.0%)

Quai Jeanrenaud 3

2000 Neuchâtel, CH

72 Inventor/es:

BEUCHAT, JULIEN;
CAMPANONI, PRISCA;
DAI, SHUNHONG;
FACCHINETTI, CLAUDIO;
LUGON-MOULIN, NICOLAS;
MUNDELL, RICHARD;
OISHI, KAREN;
RAMIREZ, GUSTAVO;
ROESTI, SANDRINE;
LAPARRA, HELENE y
CABRERA, ROSA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 637 825 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

Expresión de proteínas en plantas

- 5 La presente invención se refiere a la expresión de proteínas en plantas. En particular, la presente invención se dirige a métodos para la producción a gran escala de polipéptidos recombinantes en plantas de tabaco completas.

El tabaco se ha usado como una planta hospedera para estudiar la expresión de proteínas heterólogas en plantas. Se ha descrito la expresión transitoria de diversas proteínas heterólogas mediante el uso de *Nicotiana benthamiana*, pero esta especie, aunque es útil como un modelo de prueba en el laboratorio, produce menos biomasa y no es susceptible para la industrialización de una plataforma para la obtención de grandes cantidades de una proteína recombinante en un período de tiempo corto. La expresión génica transitoria en plantas y células vegetales se ha desarrollado principalmente como un medio rápido para demostrar la producción de una proteína dada en pequeñas cantidades y para analizar construcciones genéticas. Los métodos para introducir una secuencia codificante de una proteína en una célula vegetal o una planta incluyen, por ejemplo, suministro por cañón de partículas, infiltración al vacío, transmisión mediada por *Agrobacterium*, y suministro de ADN desnudo mediado por polietilenglicol en protoplastos vegetales.

La transformación estable se ha demostrado para muchas especies de plantas diferentes, tales como por ejemplo *Medicago truncatula*, *Brassica napus*, *Lactuca sativa*, *Zea mays*, *Oryza sativa* y especies de tabaco, que incluyen *Nicotiana tabacum*. *N. tabacum* se considera un híbrido de *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, y posiblemente *Nicotiana glauca*. Sólo se encuentra en cultivos, y numerosos cultivares y variantes se cultivan comercialmente en muchas regiones climáticas y geográficas diferentes. Están bien reconocidas las variaciones morfológicas, las propiedades agronómicas y las diferencias químicas entre las variantes y cultivares de *N. tabacum*. Sin embargo, sólo se dispone de una información limitada sobre la relación entre las características físicas y la diversidad genética de variantes y cultivares de *N. tabacum*. Incluso se sabe menos acerca de la idoneidad de cada una de tales variantes y cultivares para la producción de proteínas recombinantes. Los cultivos actuales a gran escala de células animales comerciales para la producción de proteínas recombinantes se construyen en sólo unas pocas líneas de células huésped, cada una de las cuales se ha caracterizado ampliamente. Por el contrario, ninguna de dichas informaciones se ha desarrollado para las células vegetales derivadas de variantes, líneas de mejoramiento y cultivares de tabaco, ni para la planta completa.

Aunque se ha establecido la transformación estable de *N. tabacum* generalmente para la producción de proteínas recombinantes, la expresión transitoria de un gen extraño en células vegetales de *N. tabacum* solo se ha demostrado en varios casos. Estos estudios de expresión transitoria en *Nicotiana tabacum* se han limitado a la infiltración de células vegetales comprendidas dentro de hojas jóvenes cortadas o discos de hojas de *N. tabacum* cv. Petit Havana (Rodríguez y otros, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 89: 188-194; Potula, y otros, *Transgenic Res.*, 2008, 17: 19-32) o la inyección de hojas todavía unidas a una planta mediante inyección manual en los espacios aéreos abaxiales de hojas completas justo debajo de la superficie epidérmica mediante el uso de una jeringa de 1 ml. Ninguno de estos experimentos describe un sistema técnicamente robusto y comercialmente significativo para la producción a gran escala de proteínas recombinantes que se base en la planta completa de *N. tabacum*.

Y.V. Sheludko (Recent Patent on Biotechnology, vol. 2, no. 3, 2008, páginas 198-208) analiza la expresión transitoria de proteínas en plantas tales como el tabaco. I.a., Sheludko analiza criterios para seleccionar hospederos vegetales e intervalos de concentraciones de *Agrobacterium*. Sheludko se refiere además a informes anteriores de la técnica relacionados con rendimientos de proteínas recombinantes de hasta 400 mg/kg de biomasa en bruto.

Un análisis comparativo reciente de Conely y otros (*Plant Biotechnol J*, 2010 1-11) indica que el nivel de expresión transitoria varió significativamente entre una pequeña muestra de diferentes variedades de *Nicotiana* analizadas, y que no existe una correlación entre el rendimiento de la expresión transitoria y la expresión estable para una variedad dada. Este estudio señala la idea de que para la expresión transitoria de una proteína recombinante, existe una enorme imprevisibilidad en el rendimiento entre las variedades y cultivares de *N. tabacum*. El análisis de la expresión transitoria realizado por Conely y otros se llevó a cabo en hojas inyectadas directamente con suspensiones de *Agrobacterium* a escala de laboratorio. Muchos otros aspectos del método de expresión transitoria que pueden afectar el rendimiento no se entienden, especialmente cuando el método se lleva a mayor escala, tal como la metodología de infiltración, el diseño de la construcción de expresión, y las condiciones agronómicas/de cultivo en grandes volúmenes.

Dado que el sistema de expresión en plantas se ha considerado una alternativa prometedora al cultivo de células animales para la producción a gran escala de proteínas recombinantes, existe una necesidad urgente de desarrollar plataformas de fabricación basadas en plantas comercialmente viables donde las variables que son importantes a escala industrial, puedan investigarse y optimizarse.

La presente invención se dirige y resuelve esta necesidad insatisfecha al proporcionar un método como se define por las características de las reivindicaciones independientes. Las modalidades preferidas son objeto de las reivindicaciones dependientes. La presente invención proporciona métodos que usan combinaciones

preseleccionadas y compatibles de variedades de *N. tabacum* y cepas de *Agrobacterium* para la producción a gran escala de polipéptidos heterólogos mediante expresión transitoria. Los resultados descritos en el presente documento más adelante muestran de manera inesperada que entre las muchas variedades de *Nicotiana tabacum* analizadas, no hubo correlación entre un nivel alto de acumulación del polipéptido heterólogo y una baja actividad

5 proteínasa- una característica que se ha señalado por otros como un factor importante. En consecuencia, muchas de las variedades de *N. tabacum* proporcionadas en la invención no se han considerado como un huésped para la producción de proteínas heterólogas. La invención proporciona además diversas mejoras a los métodos que aumentan más aún el rendimiento general de polipéptidos heterólogos, tales como el uso de un vector binario de tamaño mínimo, la presencia de un supresor viral del silenciamiento génico en la planta hospedera, infiltración de la

10 planta completa, y condiciones y prácticas específicas para el cultivo en grandes volúmenes. El uso de una combinación preseleccionada de variedades de *N. tabacum* y cepas de *Agrobacterium*, que incluye opcionalmente una o más de las mejoras a los métodos basados en la expresión transitoria de la invención, permite la producción de grandes cantidades de un polipéptido heterólogo de manera económica y en un corto período de tiempo (con respecto al requerido por la planta transgénica).

15 En una modalidad, la presente invención se refiere a un método basado en la expresión transitoria para producir grandes cantidades de un polipéptido heterólogo en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

- (i) aplicar una prueba de necrosis para preseleccionar una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos de 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32, en donde la necrosis se determina mediante la medición de las áreas de una o más hojas necróticas y las áreas totales de las una o más hojas que se han infiltrado por células de *Agrobacterium*;
- 20 (ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0, particularmente infiltrar la planta completa mediante uno o más ciclos de presión en donde al menos uno de los ciclos de presión comprende un aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica, en donde dicha cepa comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido;
- 25 (iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 10 días en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo; y, opcionalmente;
- (iv) comprende además después de la etapa (iii), una etapa (iv) para infiltrar la planta infiltrada completa con *Agrobacterium* con una o más enzimas que degradan la pared de las células vegetales;

35 en donde el polipéptido heterólogo se expresa en una cantidad de al menos 200 mg por kg de masa de tejido vegetal.

En una modalidad específica del método anterior

- 40 i. la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido se clona en un vector binario de tamaño mínimo que comprende elementos de secuencia que son esenciales para el mantenimiento y la replicación del plásmido en células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y para la transferencia de un T-ADN a una célula vegetal de tabaco, y, opcionalmente, un gen marcador de selección en plantas, en donde la proporción de los elementos de secuencia esenciales representa al menos el 70 % de los nucleótidos de todo el vector binario
- 45 de tamaño mínimo sin la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido; y/o
- ii. la suspensión de células de *Agrobacterium* usada en la etapa (ii) para infiltrar dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* tiene una densidad celular (DO₆₀₀) en el intervalo de 0,3 a 0,9.

En diversas otras modalidades específicas la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores como se describió en el presente documento anteriormente, en donde

- 50 i. un supresor del silenciamiento génico se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* cuando se expresa la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y/o
- 55 ii. la secuencia de nucleótidos que codifica al supresor de silenciamiento génico se ubica en un primer vector binario y la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo se ubica en un segundo vector binario.

En particular, el primer vector binario se proporciona en una primera cepa de *Agrobacterium* y el segundo vector se proporciona en una segunda cepa de *Agrobacterium* y en la etapa (ii), la relación de células de la primera cepa de *Agrobacterium* que comprende el primer vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, con respecto a las células de la segunda cepa de *Agrobacterium* que comprende el segundo vector binario, está en un intervalo de 3:1 a 1,6:1.

La invención se refiere además al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus

- i. se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* cuando se expresa la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y/o
- ii. se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* mediante el uso de un segundo vector binario que está separado del primer vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y
- iii. se codifica por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 5.

En diversas modalidades, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* proporcionados en la etapa i) es una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados del grupo que consiste en la línea de *N. tabacum* DAC Mata Fina, PO2, BY-64, AS44, RG17, RG8, HB04P, Basma Xanthi BX 2A, Coker 319, Hicks, McNair 944 (MN 944), Burley 21, K149, Yaka JB 125/3, Kasturi Mawar, NC 297, Coker 371 Gold, PO2, Wisliça, Simmaba, Turkish Samsun, AA37-1, B13P, F4 del cruce BU21 x Hoja Parado línea 97, Samsun NN, Izmir, Xanthi NN, Karabalgat, Denizli, PO1, PM016, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41798; PM021, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41799; PM092, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41800; PM102, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41801; PM132, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41802; PM204, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41803; PM205, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41804; PM215, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41805; PM216, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41806; y PM217, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41807, y en donde el depositario de semillas es NCIMB en Aberdeen, Escocia.

En particular, la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una cepa seleccionada del grupo que consiste en AGL1, EHA105, GV2260, GV3101 y Chry5.

En diversas otras modalidades, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados y la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una combinación seleccionada del grupo que consiste en la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y la línea PM204 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium*.

En otras modalidades de la invención, el polipéptido heterólogo producido en el método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes es

- i. un factor de crecimiento, receptor, ligando, molécula de señalización; quinasa, enzima, hormona, supresor de tumor, proteína de coagulación de la sangre, proteína del ciclo celular, proteína metabólica, proteína neuronal, proteína cardíaca, proteína deficiente en estados de enfermedad específicos, anticuerpos, inmunoglobulinas, antígenos, proteínas que proporcionan resistencia a enfermedades, proteínas para la terapia de sustitución en enfermedades genéticas humanas, proteínas antimicrobianas, interferones, y citocinas; y/o
- ii. una hemaglutinina de influenza o un fragmento inmunogénico de esta.

La presente invención se refiere, además, al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las plantas se exponen a la luz antes de la infiltración de manera que la conductancia estomática esté en un intervalo de entre $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aún en otra modalidad de la invención, el método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores comprende una etapa iii), que comprende

- i. incubar la planta en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día; y/o
- ii. incubar dicha planta infiltrada en una posición invertida.

Las modificaciones del método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores comprenden además (a) antes de la infiltración, cultivar la planta completa de tabaco de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, o (b) después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, o (c) antes de la infiltración, cultivar la planta completa de tabaco de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, y después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado.

En diversas otras modalidades, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores en donde la combinación seleccionada de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* y una cepa de una especie de *Agrobacterium* es una combinación, que da como resultado (a) la

acumulación de la proteína heteróloga a un nivel que es al menos 25 % del que puede obtenerse en *N. benthamiana* cuando se usan la misma secuencia de nucleótidos expresable y las mismas etapas de infiltración e incubación o (b) la acumulación de proteína fluorescente verde hasta al menos 1 % del total de proteína soluble de la planta infiltrada, cuando la secuencia de nucleótidos expresable codifica una proteína fluorescente verde, y se usan las mismas etapas de infiltración e incubación.

Finalmente, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores en donde la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido se clona en un vector binario que comprende una región de T-ADN que comprende una o dos o más copias de un promotor FLt o un fragmento funcional de este, en donde el promotor FLt es el de MMV, FMV o PCISV, particularmente un promotor FLt según se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11, la sec. con núm. de ident.: 12, la sec. con núm. de ident.: 13, o la sec. con núm. de ident.: 14.

La presente invención se define por las modalidades precedentes y por las reivindicaciones. Cualquier objeto identificado en la solicitud como "invención", "modalidad", "aspecto", etcétera, que supere el alcance de la invención tal como se representa por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada pero sólo sirve como información de los antecedentes para entender mejor la invención.

La invención se refiere a un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos de 10 % de necrosis, menos de 5 % de necrosis, menos de 2 % de necrosis, menos de 1 % de necrosis, 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;
- (ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas;
- (iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 20 días, particularmente entre 7 días y 15 días, pero especialmente entre 8 días y 10 días, en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos de 10 % de necrosis, menos de 5 % de necrosis, menos de 2 % de necrosis, menos de 1 % de necrosis, 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante una jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;
 - (ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0;
 - (iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 20 días, particularmente entre 7 días y 15 días, pero especialmente entre 8 días y 10 días, en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo;
- con la condición de que cuando la secuencia de nucleótidos expresable codifique una proteína fluorescente verde, la acumulación de la proteína fluorescente verde sea al menos 1 % del total de proteína soluble de la planta o células vegetales infiltradas; o que la acumulación del polipéptido sea a un nivel que es al menos 25 % del que puede obtenerse en *N. benthamiana* cuando la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que comprende la misma secuencia de nucleótidos expresable se usa según se describe en la etapa ii) y la etapa iii).

Por lo tanto, se prefiere que la combinación seleccionada de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* y una cepa de una especie de *Agrobacterium*, cuando se usa en el método de acuerdo con la invención y según se define en la presente descripción en cualquiera de las modalidades precedentes, sea una combinación, que cuando se usa de acuerdo con la invención, da como resultado la acumulación de la proteína fluorescente verde hasta al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 4 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % del total de proteína soluble de la planta infiltrada, cuando la secuencia de nucleótidos expresable codifica una proteína fluorescente verde.

Se prefiere además que la combinación seleccionada de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* y una cepa de una especie de *Agrobacterium*, en el método de acuerdo con la invención según se define en la presente descripción en cualquiera de las modalidades precedentes, de lugar a la acumulación de

una proteína heteróloga a un nivel que es al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, o igual a, o que sea al menos 110 %, al menos 125 %, al menos 150 %, al menos 200 %, al menos 250 %, al menos 300 %, al menos 400 %, o al menos 500 % que el que puede obtenerse en *N. bentamiana* cuando se aplican la misma secuencia de nucleótidos expresable y las mismas condiciones. La acumulación de la proteína heteróloga puede expresarse en términos de unidad de masa (tal como gramo) de la proteína heteróloga por unidad de masa (tal como kg) del peso fresco (FW) de hojas, que es g/kg FW.

En una modalidad alternativa, la invención se refiere a un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos, en *Nicotiana tabacum*; el método comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos de 10 % de necrosis, menos de 5 % de necrosis, menos de 2 % de necrosis, menos de 1 % de necrosis, en 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;
- (ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0;
- (iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 20 días, particularmente entre 7 días y 15 días, pero especialmente entre 8 días y 10 días, en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta infiltrada y la acumulación de la proteína recombinante,

con la condición de que la infiltración de acuerdo con la etapa ii) no se lleve a cabo con un método según se describe y se reivindica en la solicitud de patente de EP núm. 10 16 9888.4, presentada el 16 de julio de 2010, particularmente con un método que comprende:

- (i) poner en contacto una planta completa, o una parte de una planta con células de *Agrobacterium* en un fluido, en donde las células de *Agrobacterium* comprenden una construcción expresable que codifica a la proteína o péptido heterólogos;
- (ii) tratar la planta completa o la parte de una planta y las células de *Agrobacterium* con uno o más ciclos de presión con lo que las células de *Agrobacterium* infiltran la planta completa, o la parte de la planta, y en donde al menos uno de los ciclos de presión comprende un aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica.

En otra modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las células de *Agrobacterium* comprenden un vector binario, particularmente un vector binario de tamaño mínimo que comprende elementos de secuencia, que son esenciales para el mantenimiento y la replicación del plásmido en células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y para la transferencia del T-ADN a una célula vegetal de tabaco, y además una región de T-ADN, que comprende la secuencia codificante de un péptido o proteína que está bajo el control de elementos reguladores funcionales en una planta de *Nicotiana tabacum* y, opcionalmente, un gen marcador de selección en plantas, en donde los elementos de secuencia esenciales representan al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % de todo el vector binario de tamaño mínimo.

En una modalidad específica, la invención se refiere a un método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde se usa un vector binario mínimo que comprende, que consiste, o que consiste esencialmente en los siguientes elementos de ácido nucleico:

- a) un primer elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección que es funcional en especies de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*;
- b) un segundo elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación que es funcional en *Escherichia coli*;
- c) un tercer elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación;
- d) un cuarto elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un segundo origen de replicación, que es diferente del primer origen de replicación y que es funcional en *Agrobacterium*; y
- e) un quinto elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de una región de T-ADN que comprende una secuencia del borde derecho del T-ADN y una secuencia del borde izquierdo del T-ADN de un plásmido de *Agrobacterium tumefaciens* inductor de tumores o un plásmido inductor de raíces de *Agrobacterium rhizogenes*;

en donde los elementos de ácido nucleico anteriores se proporcionan en una molécula polinucleotídica circular y están separados por secuencias de nucleótidos hueco que no tienen una función en la replicación, el mantenimiento o la transferencia de ácido nucleico, y en donde dichas secuencias de nucleótidos hueco representan menos del 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, del tamaño total del vector. Preferentemente, las secuencias de nucleótidos hueco representan menos del 20 % del tamaño total del vector.

En una modalidad de la invención, la molécula vector para usar en un método de la invención tiene un tamaño total de menos de 5900 pb, particularmente de menos de 5500 pb, particularmente de menos de 5200 pb, particularmente de menos de 5100 pb, pero especialmente 5139 pb.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho vector binario mínimo se basa en el plásmido pRK2 que tiene una amplia variedad de huéspedes.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho vector binario mínimo tiene una secuencia polinucleotídica que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, pero particularmente 100 % idéntica a la secuencia polinucleotídica como se representa en la sec. con núm. de ident.: 1 y en donde los elementos de ácido nucleico (a) a (e) muestran la misma funcionalidad que los elementos de la contraparte proporcionados en la sec. con núm. de ident.:1.

En una modalidad específica, el vector binario de tamaño mínimo tiene una secuencia como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido se clona en un vector binario de tamaño mínimo que comprende elementos de secuencia que son esenciales para el mantenimiento y la replicación del plásmido en células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y para la transferencia de un T-ADN a una célula vegetal de tabaco, y, opcionalmente, un gen marcador de selección en plantas, en donde la proporción de los elementos de secuencia esenciales representa al menos 70 % de los nucleótidos de todo el vector binario de tamaño mínimo sin la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde un supresor del silenciamiento génico se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* cuando se expresa la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el supresor del silenciamiento génico es una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el supresor del silenciamiento génico es uno codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 5.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el supresor del silenciamiento génico, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus de la sec. con núm. de ident.: 5, se ubica en un primer vector binario y el polipéptido heterólogo se ubica en un segundo vector binario.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con la presente invención según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el primer vector binario se proporciona en una primera cepa de *Agrobacterium* y el segundo vector se proporciona en una segunda cepa de *Agrobacterium* y en donde en la etapa (ii), la relación de células de la primera cepa de *Agrobacterium* que comprende el primer vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, con respecto a las células de la segunda cepa de *Agrobacterium* que comprende el segundo vector binario que comprende el supresor del silenciamiento génico, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus de la sec. con núm. de ident.: 5, está en un intervalo de 3:1 a 1,6:1.

En otra modalidad, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde las secuencias reguladoras operables en plantas que controlan la expresión del polipéptido heterólogo comprenden un promotor, particularmente uno de los promotores como se describe en la presente descripción más adelante, pero particularmente un promotor de HT-CPMV como tal, particularmente un promotor de HT-CPMV o combinado con el promotor mínimo de 35S CaMV como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2.

En otra modalidad, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde las secuencias reguladoras operables en plantas que controlan la expresión del polipéptido heterólogo comprenden un promotor, particularmente uno de los promotores como se describe en la presente descripción más adelante, pero particularmente un promotor FLt o un fragmento funcional de este, en donde el promotor FLt es el de MMV, FMV o PCISV, particularmente el promotor FLt según se proporciona en la sec. con

núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11, la sec. con núm. de ident.: 12, la sec. con núm. de ident.: 13, o la sec. con núm. de ident.: 14.

En una modalidad específica, la presente invención se refiere a un método para producir un polipéptido heterólogo en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos del 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;

(ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, de la sec. con núm. de ident.: 5 y una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido, y, opcionalmente, aplicar uno o más ciclos de presión en donde al menos uno de los ciclos de presión comprende un aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica,

(iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 10 días en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo.

En otra modalidad específica, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido heterólogo en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos del 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;

(ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, particularmente una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus, de la sec. con núm. de ident.: 5 y una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de un promotor FLt o un fragmento funcional de este, en donde el promotor FLt es el de MMV, FMV o PCISV, particularmente un promotor FLt según se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11, la sec. con núm. de ident.: 12, la sec. con núm. de ident.: 13, o la sec. con núm. de ident.: 14; y, opcionalmente, aplicar uno o más ciclos de presión en donde al menos uno de los ciclos de presión comprende un aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica,

(iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 10 días en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo.

Opcionalmente, las secuencias reguladoras incluyen una secuencia líder en 5' no traducida, una señal de poliadenilación, o uno o más potenciadores, o una combinación de los anteriores. La presente invención contempla además otras secuencias reguladoras como conocen los expertos en la técnica, y como se describe en la presente descripción más adelante, que incluyen un supresor del silenciamiento génico.

Por lo tanto, en una modalidad adicional, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos expresable que codifica la proteína o polipéptido, particularmente la proteína o polipéptido heterólogos, comprende además la secuencia codificante del supresor de silenciamiento génico asociado operativamente con elementos reguladores que funcionan en la planta de tabaco.

En una modalidad, la invención se refiere al método de las modalidades precedentes, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* comprende un supresor de silenciamiento génico, particularmente un supresor de silenciamiento génico de origen viral, y particularmente un supresor de silenciamiento génico seleccionado del grupo que consiste en la proteína p19 del virus de la necrosis del pepino (CNV), la proteína p1 del virus del moteado amarillo del arroz (RYMV), la proteína p25 del virus X de la patata (PVX), la proteína AC2 del virus del mosaico de la yuca africana (ACMV), la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) y la proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus.

En una modalidad adicional, la invención se refiere al método de conformidad con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho método comprende infiltrar dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados con una segunda suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden un vector binario que comprende la secuencia codificante del supresor de silenciamiento génico. La segunda suspensión de células de *Agrobacterium* puede ser opcionalmente de la misma cepa que la cepa de *Agrobacterium* seleccionada. La primera

suspensión y la segunda suspensión de células de *Agrobacterium* pueden infiltrarse en cualquier secuencia o simultáneamente. La primera suspensión y la segunda suspensión de células de *Agrobacterium* pueden mezclarse antes de usarse para infiltrar la planta de tabaco. Opcionalmente, la primera suspensión y la segunda suspensión de células de *Agrobacterium* se mezclan en una relación definida del número de células de cada suspensión.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde una suspensión de células de *Agrobacterium* se usa en la etapa (ii) para la infiltración de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* con una densidad celular (DO_{600}) en el intervalo de 0,1 a 1,0, particularmente 0,3 a 0,9, particularmente 0,5 a 0,8, y particularmente 0,15 a 0,35.

En otra modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* proporcionados en la etapa i) es una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados del grupo que consiste en la línea de *N. tabacum* PM016, PM021, PM92, PM102, PM132, PM204, PM205, PM215, PM216 o PM217 según se depositaron en NCIMB, Aberdeen, Escocia, o DAC Mata Fina, PO2, BY-64, AS44, RG17, RG8, HB04P, Basma Xanthi BX 2A, Coker 319, Hicks, McNair 944 (MN 944), Burley 21, K149, Yaka JB 125/3, Kasturi Mawar, NC 297, Coker 371 Gold, PO2, Wisliça, Simmaba, Turkish Samsun, AA37-1, B13P, F4 del cruce BU21 x Hoja Parado línea 97, Samsun NN, Izmir, Xanthi NN, Karabalgat, Denizli y PO1.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la variedad vegetal, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* proporcionados en la etapa i) es una de cualquiera de la línea PM016 de *Nicotiana tabacum*, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. (una Autoridad Internacional de Depósito en virtud del Tratado de Budapest, ubicada en Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Reino Unido) con el número de registro del NCIMB 41798; PM021, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41799; PM092, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41800; PM102, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41801; PM132, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41802; PM204, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41803; PM205, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41804; PM215, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41805; PM216, depositada con el número de registro del NCIMB 41806; y PM217, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41807.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* seleccionada del grupo que consiste en AGL1, EHA105, GV2260, GV3101 y Chry5.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es la cepa AGL1 o EHA105 de *Agrobacterium*.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la combinación de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados y la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una combinación seleccionada del grupo que consiste en la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la combinación de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados y la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una combinación seleccionada del grupo que consiste en la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y la línea PM204 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha cepa de *Agrobacterium tumefaciens* comprende además la secuencia de nucleótidos expresable de una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus.

En una modalidad, la invención se refiere a un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en una planta, particularmente una planta del género *Nicotiana*, particularmente una planta de *Nicotiana tabacum*; el método comprende las etapas de:

infiltrar una planta completa de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados, particularmente una planta del género *Nicotiana*, particularmente una planta de *Nicotiana tabacum* con una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas, particularmente con una suspensión de una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium* a una DO_{600} de

entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas;

(iii) incubar la planta infiltrada, particularmente durante un período de entre 5 días y 20 días, particularmente entre 7 días y 15 días, pero especialmente entre 8 días y 10 días, en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde, antes de la infiltración, las plantas se exponen a la luz de manera que la conductancia estomática esté en un intervalo de entre $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, particularmente de entre $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, particularmente de entre $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, particularmente de entre $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $450 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de infiltración comprende exponer las partes principales de la planta *in situ* que incluyen hojas de la planta y/o flores de la planta y/o tallo de la planta y/o raíces de la planta, pero particularmente la planta completa, a una presión que es menor que la presión atmosférica o un vacío.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de infiltración comprende exponer las partes principales de la planta *in situ* que incluyen hojas de la planta y/o flores de la planta y/o tallo de la planta y/o raíces de la planta, pero particularmente la planta completa, a una presión que es mayor que la presión atmosférica.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la etapa iii) comprende incubar la planta en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día, preferentemente ocho horas por día. El método es particularmente útil para mejorar el nivel de expresión transitoria de la proteína heteróloga.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la etapa iii) comprende incubar dicha planta infiltrada en una posición vertical hacia arriba o, alternativamente, en una posición invertida.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho polipéptido heterólogo es una hemaglutinina de influenza o un fragmento inmunogénico de esta.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho método comprende además incubar la planta infiltrada completa en una posición invertida, o en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día, o ambos.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, dicho método comprende además (a) antes de la infiltración, cultivar la planta completa, particularmente planta completa del género *Nicotiana*, particularmente una planta de tabaco de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 400 y 550 plantas por metro cuadrado, o (b) después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 400 y 550 plantas por metro cuadrado, o (c) antes de la infiltración, cultivar la planta completa, particularmente una planta completa del género *Nicotiana*, particularmente una planta completa de tabaco de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *N. tabacum* a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 400 y 550 plantas por metro cuadrado, y después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 400 y 550 plantas por metro cuadrado.

En una modalidad específica, el método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes comprende (a) antes de la infiltración, cultivar una planta completa, particularmente una planta completa del género *Nicotiana*, particularmente una planta completa de tabaco de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado, particularmente a una densidad de entre 400 y 550 plantas por metro cuadrado, y (b) infiltrar dichas plantas cuando hayan alcanzado una altura de entre 30 cm y 50 cm, particularmente de entre 35 cm y 45 cm.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde las plantas infiltradas, particularmente plantas infiltradas del género *Nicotiana*, particularmente las plantas de tabaco infiltradas con *Agrobacterium* se infiltran con una solución enzimática acuosa que comprende una o más enzimas que degradan o digieren la pared de la célula vegetal para ayudar a la extracción y purificación de la

proteína heteróloga. En particular, la solución enzimática comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y poligalacturonasas. Las celulasas que pueden usarse incluyen endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (denominadas además exoglucanasa, E.C. 3.2.1.91), o β -glucosidasas (denominadas además celobiasa, E.C. 3.2.1.21). Después de la infiltración con las enzimas, las plantas pueden incubarse durante un período de tiempo que se encuentra en el intervalo de al menos 1, 2, 5, 10, 12, 18, a 24 horas.

Aún en otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de hemaglutinina 5 de influenza (H5), particularmente un polipéptido de hemaglutinina 5 de influenza (H5) como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 8, producido en una planta, particularmente una planta del género *Nicotiana*, particularmente una planta de tabaco de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados mediante un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores.

Aún en otra modalidad, la invención proporciona un sistema para producir un polipéptido heterólogo en una planta completa, particularmente una planta completa del género *Nicotiana*, particularmente una planta completa de tabaco de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *N. tabacum* seleccionados de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas, particularmente una suspensión que comprende células de la cepa de la especie de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, un medio para infiltrar plantas completas, particularmente con células de *Agrobacterium*, y opcionalmente un invernadero para la incubación de la planta infiltrada que se adapta para sustentar (a) la incubación de la planta infiltrada en una posición invertida con iluminación desde arriba durante siete a nueve horas por día, (b) el cultivo o la incubación de la planta completa a una densidad de al menos 75 plantas por metro cuadrado o (c) ambos.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho polipéptido heterólogo es un factor de crecimiento, receptor, ligando, molécula de señalización; quinasa, enzima, hormona, supresor de tumor, proteína de coagulación de la sangre, proteína del ciclo celular, proteína metabólica, proteína neuronal, proteína cardiaca, proteína deficiente en estados de enfermedad específicos, anticuerpos, antígenos, proteínas que proporcionan resistencia a enfermedades, proteínas para la terapia de sustitución en enfermedades genéticas humanas, proteínas antimicrobianas, interferones, y citocinas. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a antígenos virales, tales como la hemaglutinina de influenza.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método general para incubar una planta infiltrada que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido, particularmente un polipéptido heterólogo, dicho método comprende incubar la planta en una posición invertida. El método es particularmente útil para mejorar el nivel de expresión transitoria de la proteína heteróloga. Preferentemente, la planta que se incuba en una posición invertida es una planta completa que se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido, particularmente un polipéptido heterólogo. En otra modalidad, la planta que se incuba en una posición invertida es una planta transgénica. En determinadas modalidades, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de incubación comprende incubar la planta infiltrada en una posición invertida. Se proporciona además un invernadero que se adapta para sustentar la incubación de plantas infiltradas en una posición invertida durante cualquier período de tiempo, en donde las plantas infiltradas en posición invertida se iluminan desde arriba.

Aún en otro aspecto de la invención, se proporciona un método general para incubar una planta infiltrada que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido, particularmente un polipéptido heterólogo, dicho método comprende incubar la planta en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día, preferentemente ocho horas por día. El método es particularmente útil para mejorar el nivel de expresión transitoria de la proteína heteróloga. Preferentemente, la planta infiltrada es una planta completa que se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido, particularmente un polipéptido heterólogo. Preferentemente, la planta que se incuba es la planta a la luz durante siete a nueve horas por día, preferentemente ocho horas por día. En determinadas modalidades, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de incubación comprende incubar la planta infiltrada en una posición invertida.

Aún en otro aspecto de la invención, se proporciona un método general para incubar una pluralidad de plantas infiltradas dentro de un área definida, en donde el número de plantas infiltradas por unidad de área es mayor que el promedio que se usa para cultivar plantas transgénicas. El método comprende incubar al menos 25 a 500 plantas infiltradas por metro cuadrado, o al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 300, al menos 400 plantas infiltradas por metro cuadrado. Preferentemente, la planta es una planta completa que se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido, particularmente un polipéptido heterólogo. El método es particularmente útil para reducir el costo de producción del polipéptido heterólogo. Se proporciona además un invernadero que se adapta para incubar al menos 25 a 500 plantas infiltradas por metro cuadrado, o al menos 100 plantas infiltradas por metro cuadrado. En

determinadas modalidades, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicha etapa de incubación comprende incubar la planta infiltrada con otras plantas infiltradas en un área definida, en donde la densidad de plantas infiltradas en el área es al menos 25 a 500 plantas infiltradas por metro cuadrado, o al menos 100 plantas infiltradas por metro cuadrado.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición que comprende una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos del 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes que comprende una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0.

En una modalidad las células de *Agrobacterium* en dicha composición tienen una densidad celular (DO₆₀₀) de al menos 2,1, al menos 2,4, al menos 2,7, al menos 3,0, al menos 3,3, al menos 3,6, al menos 3,8, al menos 3,9, al menos 4,0.

En una modalidad la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* en dicha composición se selecciona del grupo que consiste en la línea de *N. tabacum* PO2, AS44, Wislica, Simmaba, PM132, PM092, PM016, RG17, RG8, HB04P, Basma Xanthi BX 2A, Coker 319, Hicks, McNair 944 (MN 944), Burley 21, K149, Yaka JB 125/3, PM102, NC 297, PM021, AA37-1, B13P, F4 del cruce BU21 x Hoja Parado, línea 97, Samsun, PO1, PM204, PM205, PM215, PM216 y PM217.

En una modalidad la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* en dicha composición se selecciona del grupo que consiste en la línea PM016 de *Nicotiana tabacum*, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. (una Autoridad Internacional de Depósito en virtud del Tratado de Budapest, ubicada en Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Reino Unido) con el número de registro del NCIMB 41798; PM021, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41799; PM092, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41800; PM102, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41801; PM132, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41802; PM204, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41803; PM205, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41804; PM215, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41805; PM216, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41806; y PM217, cuyas semillas se depositaron el 6 de enero de 2011 en NCIMB Ltd. con el número de registro del NCIMB 41807

En una modalidad, la cepa de *Agrobacterium* seleccionada en cualquiera de las composiciones descritas previamente es una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* seleccionada del grupo que consiste en AGL1, EHA105, GV2260, GV3101 y Chry5.

En una modalidad, la cepa de *Agrobacterium* seleccionada en cualquiera de las composiciones descritas previamente es la cepa AGL1 o EHA105 de *Agrobacterium*.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición que comprende una combinación de la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* o la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición que comprende una combinación de la línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* o la línea PM204 de *Nicotiana tabacum* con la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha cepa de *Agrobacterium* comprende además la secuencia de nucleótidos expresable de una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus.

DEFINICIONES

Las expresiones y términos técnicos y científicos usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente tendrán el significado aplicado comúnmente para ellos en la técnica pertinente a la biología vegetal. En la presente descripción se hace referencia a diversas metodologías conocidas por los expertos en la técnica. La práctica de la

invención empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ingeniería genética y biología vegetal, que están dentro del conocimiento de la técnica.

5 Cualquier material y/o métodos adecuados conocidos por los expertos pueden utilizarse en la práctica de la presente invención: sin embargo, se describen los materiales y/o métodos preferidos. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en la siguiente descripción y los ejemplos pueden obtenerse de fuentes comerciales, a menos que se indique de cualquier otra manera.

10 Todas las definiciones de los términos siguientes se aplican a todo el contenido de esta solicitud. La palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas, y los artículos indefinidos "un" o "una" no excluyen una pluralidad. Una sola etapa puede cumplir con las funciones de varias características enumeradas en las reivindicaciones. Los términos "esencialmente", "alrededor de", "aproximadamente" y similares en conexión con un atributo o un valor particularmente también definen exactamente el atributo o exactamente el valor, respectivamente. El término "aproximadamente" en el contexto de un valor o intervalo numérico dado se refiere a un valor o intervalo que está
15 dentro del 20 %, dentro del 10 %, o dentro del 5 % del valor o intervalo dado.

El término "planta" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier planta en cualquier etapa de su ciclo de vida o desarrollo, y a sus progenies.

20 Una "parte de la planta" o "parte de una planta" como se usa en la presente descripción está destinado a referirse a cualquier parte de una planta, es decir un órgano de una planta, un tejido vegetal, una célula vegetal, un embrión, una hoja, etcétera, en una planta o en un cultivo. En determinadas modalidades de la invención relacionadas con la inoculación de la planta bajo presión alta o baja o una combinación de estas, este término se refiere a partes vegetales en la planta.

25 Una "planta de tabaco" como se usa dentro de la presente invención se refiere a una planta de una especie que pertenece al género *Nicotiana*, que incluye pero no se limita a *Nicotiana tabacum* (o *N. tabacum*). Determinadas modalidades de la invención se describen en el presente documento mediante el uso del término "planta de tabaco" sin especificar *Nicotiana tabacum*, tales descripciones deben interpretarse que incluyen *Nicotiana tabacum*
30 específicamente.

Una "célula vegetal" o "célula vegetal de tabaco" como se usa dentro de la presente invención se refiere a una unidad estructural y fisiológica de una planta, particularmente una planta de tabaco. La célula vegetal puede estar en la forma de un protoplasto sin una pared celular, una sola célula aislada o una célula en cultivo, o como una parte de
35 una unidad más organizada, tal como pero sin limitarse a, un tejido vegetal, un órgano de una planta, o una planta completa.

El término "material vegetal" como se usa en la presente invención se refiere a cualquier composición sólida, líquida o gaseosa, o combinaciones de estas, que puede obtenerse a partir de una planta, que incluye hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, cortes, secreciones, extractos, cultivos de células o tejidos, o cualquiera de otras partes o productos de una planta.

40 El término "tejido vegetal" como se usa en la presente descripción se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural o funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta in planta o en cultivo. Este término incluye, pero no se limita a, plantas completas, órganos de plantas, y semillas.

Un "órgano de una planta" como se usa en la presente descripción se refiere a una parte de una planta distinta o diferenciada tales como una raíz, tallo, hoja, brote de flor o embrión.

50 El término "densidad óptica" o "DO" se refiere a la determinación óptica de la absorbancia de un elemento óptico a una longitud de onda dada (por ejemplo 600 nm = DO₆₀₀) medida en un espectrofotómetro.

El término "polinucleótido" se usa en la presente descripción para referirse a un polímero de nucleótidos, que puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) modificados o no. En consecuencia, un
55 polinucleótido puede ser, sin limitación, un ADN genómico, ADN complementario (ADNc), ARNm, o ARN antisentido. Además, un polinucleótido puede ser ADN monocatenario o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias o bicatenarias, una molécula híbrida que comprende ADN y ARN, o una molécula híbrida con una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Adicionalmente, el polinucleótido puede estar compuesto de regiones de triple cadena que comprenden ADN, ARN, o ambos. Un polinucleótido puede contener una o más bases
60 modificadas, tales como fosfotioatos, y puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA). Generalmente, los polinucleótidos proporcionados por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos aislados o clonados de ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos, o nucleótidos individuales, o una combinación de los anteriores.

65 El término "secuencia génica" como se usa en la presente descripción se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido que codifica una proteína o polipéptido, particularmente una

proteína o polipéptido heterólogos o un ARN biológicamente activo, y abarca la secuencia de nucleótidos de una secuencia codificante parcial que solo codifica un fragmento de una proteína heteróloga. Una secuencia génica puede incluir además secuencias que tienen una función reguladora sobre la expresión de un gen, que se ubican corriente arriba o corriente abajo con respecto a la secuencia codificante así como secuencias intrónicas de un gen.

Los términos "secuencia nucleotídica reguladora de la transcripción" o "secuencias reguladoras", se refieren cada una a secuencias de nucleótidos que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia de nucleótidos asociada (o unida funcionalmente) que se va a transcribir. La secuencia nucleotídica reguladora de la transcripción puede tener diversas localizaciones con respecto a las secuencias de nucleótidos que se van a transcribir. La secuencia nucleotídica reguladora de la transcripción puede ubicarse corriente arriba (secuencias no codificantes en 5'), dentro, o corriente abajo (secuencias no codificantes en 3') de la secuencia que se va a transcribir (por ejemplo, una secuencia codificante). Las secuencias nucleotídicas reguladoras de la transcripción pueden seleccionarse del grupo que comprende potenciadores, promotores, secuencias líder de la traducción, intrones, secuencias no traducidas en 5', secuencias no traducidas en 3', y secuencias señales de poliadenilación. Estas incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales.

El término "promotor" se refiere a la secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de un gen que dirige la iniciación de la transcripción del gen. Generalmente, las secuencias promotoras son necesarias, pero no siempre son suficientes, para conducir la expresión de un gen al que se une operativamente. En el diseño de una construcción genética expresable, el gen se coloca en suficiente proximidad y en una orientación adecuada con respecto a un promotor de manera que la expresión del gen esté controlada por la secuencia promotora. El promotor se ubica preferentemente corriente arriba con respecto al gen y a una distancia del sitio de inicio de la transcripción que se aproxima a la distancia entre el promotor y el gen que éste controla en su ambiente natural. Como se conoce en la técnica, puede tolerarse alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor. Como se usa en la presente descripción, el término "unido operativamente" significa que un promotor está conectado a una región codificante de una manera tal que la transcripción de esa región codificante se controla y regula por ese promotor. Los medios para unir operativamente un promotor a una región codificante se conocen bien en la técnica.

El término "supresor del silenciamiento génico" usado en el contexto de esta invención se refiere a proteínas codificadas por virus que permiten que determinados virus eludan el silenciamiento génico postranscripcional mediante la unión al ARN de silenciamiento. Además, los transgenes cuando se introducen en una célula vegetal, pueden desencadenar un silenciamiento génico postranscripcional como resultado de lo cual se establece una baja o ninguna expresión de tales genes.

Los términos "proteína", "polipéptido", "péptido" o "fragmentos peptídicos" como se usan en la presente descripción son intercambiables y se definen para referirse a una biomolécula compuesta de dos o más aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico, que puede plegarse en estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias para lograr una morfología particular.

El término "heterólogo" como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia biológica que no tiene un origen natural en el contexto de un polinucleótido o polipéptido específico en una célula o un organismo. Los términos "proteína recombinante" o "proteína heteróloga" o "polipéptido heterólogo", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una proteína o polipéptido que se produce por una célula pero no tiene un origen natural en la célula. Por ejemplo, la proteína recombinante o heteróloga producida en una célula vegetal o planta completa puede ser una proteína humana o de mamífero.

La proteína heteróloga que puede expresarse en una célula vegetal modificada puede ser un antígeno (que, sin limitación, puede usarse en una vacuna) que incluye pero no se limita a una proteína de un patógeno, una proteína viral, una proteína bacteriana, una proteína protozoaria, una proteína de nematodos; una enzima, que incluye pero no se limita a una enzima (que puede usarse, sin limitación, en el tratamiento de una enfermedad humana o para usos industriales); una citocina; un fragmento de un receptor de citocina; una proteína sanguínea; una hormona; un fragmento de un receptor hormonal, una lipoproteína; un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo.

Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominios (VH, VHH, VLA), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por enlace disulfuro (sdFv) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas inmunoglobulínicas y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas inmunoglobulínicas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas inmunoglobulínicas pueden ser de cualquier tipo de clase (por ejemplo, las clases IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

El término “expresable” en el contexto de esta invención se refiere a una unión operativa de un gen a elementos reguladores que dirigen la expresión de la proteína o polipéptido codificado por el gen en células vegetales dentro de una hoja.

Los términos “necrosis” y “respuesta necrótica” como se usan en la presente descripción indistintamente se refieren a una respuesta hipersensible en el tejido de una planta, particularmente una planta de tabaco, desencadenada, por ejemplo, por la inoculación del tejido vegetal con, por ejemplo, una cepa de *Agrobacterium*. La necrosis se observa cuando un tejido foliar inyectado ha colapsado y las células mueren (ver Klement y Goodman, *Annual Review of Phytopathology* 5 (1967) 17-44). Un experto en la técnica puede distinguir la necrosis del amarillamiento, que es una afección donde no hay colapso del tejido foliar ni muerte celular extensa.

Como se usa en la presente descripción, un “borde del T-ADN” se refiere a un fragmento de ADN que comprende una secuencia de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud capaz de ser reconocida por los productos génicos de virulencia de una cepa de *Agrobacterium*, tal como una cepa de *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, o una forma modificada o mutada de estas, y que es suficiente para la transferencia de una secuencia de ADN a la que está unido, hacia células eucariotas, preferentemente células vegetales. Esta definición incluye, pero no se limita a, todos los bordes de T-ADN de origen natural de los plásmidos Ti de tipo silvestre, así como cualquier derivado funcional de estos, e incluye bordes de T-ADN sintetizados químicamente. En un aspecto, la secuencia codificante y la secuencia control de la expresión de una construcción de expresión de acuerdo con la invención se ubica entre dos bordes de T-ADN.

El término “infiltración al vacío”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un método que permite la penetración de bacterias patogénicas, por ejemplo *Agrobacterium*, en los espacios intercelulares o intersticiales. Físicamente, el vacío genera una presión atmosférica negativa que provoca una disminución de los espacios de aire entre las células en el tejido vegetal. Cuanto mayor sea la duración y menor la presión, menor será el espacio de aire dentro del tejido vegetal. Un aumento posterior de la presión permite que la suspensión bacteriana usada en la infiltración se reubique dentro del tejido vegetal, y provoca que las células de *Agrobacterium* entren en contacto con las células vegetales en el interior del tejido vegetal.

Como se usa en la presente descripción, “nivel de expresión transitoria” se refiere a la capacidad de expresar al menos aproximadamente 250 microgramos, al menos aproximadamente 500 microgramos, al menos aproximadamente 750 microgramos, al menos aproximadamente 1 mg, al menos aproximadamente 2 mg, al menos aproximadamente 3 mg, al menos aproximadamente 4 mg, al menos aproximadamente 5 mg, al menos aproximadamente 10 mg, al menos aproximadamente 15 mg, al menos aproximadamente 25 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 75 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 150 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 500 mg, al menos aproximadamente 1000 mg, al menos aproximadamente 1,5 g, al menos aproximadamente 2 g, al menos aproximadamente 2,5 g, al menos aproximadamente 5 g, al menos aproximadamente 7,5 g, al menos aproximadamente 10 g, al menos aproximadamente 15 g, o al menos aproximadamente 20 g por kg de masa de tejido vegetal.

Como se usa en la presente descripción, “transitorio” se refiere a un período de tiempo que es lo suficientemente largo como para permitir el aislamiento de una proteína a partir de un tejido vegetal adecuado. Preferentemente, la expresión de proteínas tiene niveles adecuadamente altos en al menos aproximadamente 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, o al menos aproximadamente 15 días después de la introducción de la construcción de expresión en el tejido vegetal. En un aspecto, los niveles adecuadamente altos se obtienen dentro de 3-7 o 5-10 días y con mayor preferencia dentro de 3-5 o 5-7 días, después de la introducción de una construcción de expresión en el tejido vegetal.

La presente invención proporciona varias mejoras a métodos conocidos basados en la expresión transitoria en base a una combinación preseleccionada de variedades de *N. tabacum* y cepas de *Agrobacterium*, que permiten la producción de grandes cantidades de una proteína heteróloga de manera económica y en un corto período de tiempo (con respecto al necesario para una planta transgénica).

En particular, la presente invención proporciona un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una combinación de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, en donde dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos del 10 % de necrosis en 5 días después que las hojas de dicha

variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32;

(ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras operables en plantas;

(iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 10 días en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo.

Variedades de *N. tabacum*

La presente invención proporciona variedades, líneas de mejoramiento, o cultivares de *Nicotiana tabacum* preseleccionados para usar como plantas hospederas en los métodos para producir un polipéptido heterólogo mediante expresión transitoria. Es particularmente conveniente usar una de las variedades, líneas de mejoramiento, o cultivares de *Nicotiana tabacum* como una planta hospedera que se va a infiltrar con una cepa de *Agrobacterium* preseleccionada para optimizar el rendimiento del polipéptido heterólogo. Las variedades, líneas de mejoramiento, o cultivares de *Nicotiana tabacum* pueden ser los seleccionados del grupo que consiste en las líneas de *N. tabacum* PM016, PM021, PM92, PM102, PM132, PM204, PM205, PM215, PM216 o PM217 según se depositaron en el NCIMB, Aberdeen, Escocia, o DAC Mata Fina, PO2, BY-64, AS44, RG17, RG8, HB04P, Basma Xanthi BX 2A, Coker 319, Hicks, McNair 944 (MN 944), Burley 21, K149, Yaka JB 125/3, Kasturi Mawar, NC 297, Coker 371 Gold, PO2, Wisliça, Simmaba, Turkish Samsun, AA37-1, B13P, F4 del cruce BU21 x , Hoja Parado línea 97, Samsun NN, Izmir, Xanthi NN, Karabalgat, Denizli y PO1, o cualquier otra variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* que muestre menos del 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con una cepa de *Agrobacterium* seleccionada, particularmente una cepa de *Agrobacterium* identificada en el siguiente párrafo, pero especialmente las cepas de *Agrobacterium* AGL1 o EHA105, a una densidad celular de DO₆₀₀ de 0,32. En diversas modalidades, las plantas de la variedad preseleccionada de *N. tabacum* que tienen 5 a 7 semanas de edad, preferentemente 6 semanas cultivadas a partir de las semillas, se usan en la etapa de infiltración de la invención. Típicamente, tales plantas de *N. tabacum* tienen una altura que se encuentra en el intervalo de 40 a 60 mm, y preferentemente 43 a 55 mm.

Especies y cepas de *Agrobacterium*

La presente invención proporciona cepas de *Agrobacterium* preseleccionadas para usar en los métodos para producir un polipéptido heterólogo mediante la expresión transitoria de una secuencia expresable. Es particularmente ventajoso usar una de las cepas de *Agrobacterium* preseleccionadas para infiltrar una variedad de *N. tabacum* preseleccionada para optimizar el rendimiento del polipéptido heterólogo. En determinadas modalidades de la invención, las especies de *Agrobacterium* que pueden usarse en un método de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium vitis*, pero particularmente *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. En una modalidad, al menos una cepa de *Agrobacterium* comprende *Agrobacterium tumefaciens*. La especie de *Agrobacterium* usada puede ser una cepa de tipo silvestre (por ejemplo, virulenta) o una desarmada. Las cepas adecuadas de *Agrobacterium* incluyen cepas de tipo silvestre (por ejemplo, tales como *Agrobacterium tumefaciens*) o cepas en las que uno o más genes están mutados para aumentar la eficacia de la transformación, por ejemplo, tales como cepas de *Agrobacterium* en donde la expresión génica de vir y/o la inducción de este se altera debido a la presencia de los genes virA o virG mutantes o quiméricos (por ejemplo Chen y Winans, 1991, J. Bacteriol. 173: 1139-1144; y Scheeren-Groot y otros, 1994, J. Bacteriol. 176:6418-6246), las cepas de *Agrobacterium* comprenden copias extra del gen virG, tal como el gen super virG derivado de pTiBo542, preferentemente unido a un plásmido de múltiples copias, según se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 6,483,013, por ejemplo. Otras cepas adecuadas incluyen, pero no se limitan a: A. tumefaciens C58C1 (Van Larebeke y otros, Nature 252: 169-170 (1974)), A136 (Watson y otros, J. Bacteriol 123: 255-264 (1975)); LBA401 1 (Klapwijk y otros, J. Bacteriol 141: 128-136 (1980)), LBA4404 (Hoekema y otros, Nature 303: 179-180 (1983)); EHA101 (Hood y otros, J. Bac. 168: 1291-1301 (1986)); EHA105 (Hood y otros, Trans Res. 2: 208-218 (1993)); AGL1 (Lazo y otros, Bio/Technology 2: 963-967 (1991)); A281 (Hood y otros, más arriba (1986)).

En diversas modalidades específicas de la invención, pueden usarse las cepas AGL1 o EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* en el método de acuerdo con la presente invención.

En determinadas modalidades de la invención, pueden usarse múltiples suspensiones de células de *Agrobacterium*, donde cada una expresa diferentes genes para producir las proteínas individuales o una proteína heteromultimérica, o para mejorar el nivel de expresión de un polipéptido heterólogo. En tales casos, se contempla que las células de *Agrobacterium* en las diferentes suspensiones de células de *Agrobacterium* pueden ser de la misma cepa preseleccionada o de cepas preseleccionadas diferentes. Alternativamente, o adicionalmente, una única cepa de *Agrobacterium* puede comprender una pluralidad de secuencias que comprenden diferentes genes, particularmente

genes heterólogos. Los genes diferentes pueden estar comprendidos dentro de una sola molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un solo vector) o pueden proporcionarse en diferentes vectores. Un ejemplo no limitante de un segundo gen que puede expresarse en la planta hospedera es un gen que codifica un supresor del silenciamiento, de origen viral.

5

Prueba de necrosis

La invención proporciona una prueba de necrosis para preseleccionar una variedad de *Nicotiana tabacum* como planta hospedera y una cepa de *Agrobacterium* como vehículo para introducir una secuencia de nucleótidos expresable que codifica un polipéptido heterólogo en las células de la planta hospedera, en donde dicha combinación preseleccionada produce eficazmente una cantidad significativa del polipéptido heterólogo. Sin estar atados por lo siguiente, la prueba de necrosis de la invención permite la identificación de una planta hospedera que es susceptible a la infección por las células de una cepa de *Agrobacterium*, y sin embargo es resistente a la destrucción de su tejido por las células de *Agrobacterium*, por lo que sobrevive durante un período de tiempo suficiente, en el intervalo de cinco a diez días, para permitir la expresión del gen que codifica el polipéptido heterólogo y la acumulación del polipéptido heterólogo en las células vegetales infectadas. Se espera que las combinaciones de las variedades de *N. tabacum* y las cepas de *Agrobacterium* que dan lugar a necrosis significativa, produzcan menos y acumulen menos polipéptido heterólogo ya que las células vegetales infectadas mueren temprano y rápidamente, y cualquier proteína heteróloga producida se degradará en las células muertas o se perderá antes de la cosecha.

La prueba de necrosis comprende infiltrar hojas de una variedad de *N. tabacum* de seis semanas de edad mediante inyección de una suspensión de células de *Agrobacterium* a una densidad celular de DO600 de 0,32 con una jeringa. Típicamente, de manera inmediata después de la infiltración, es posible observar un sector de una hoja subtendido por las venas cerca del sitio de inyección, que se inunda con la suspensión bacteriana. El perímetro del sector se marca para evaluar más tarde. La planta completa con las hojas infiltradas se incuban en condiciones de cultivo normales, y las hojas se inspeccionan 5 días después de la infiltración. La necrosis se caracteriza por colapso del tejido vegetal y muerte celular extensa en el sector infiltrado, y puede evaluarse mediante métodos bien conocidos en la técnica (Klement y Goodman, Annual Review of Phytopathology 5 (1967) 17-44). Si las hojas infiltradas muestran menos de 20 %, menos de 10 % de necrosis, menos de 5 % de necrosis, menos de 2 % de necrosis, o menos de 1 % de necrosis, la variedad de *N. tabacum* y la cepa de *Agrobacterium* es una combinación preseleccionada de la variedad de *N. tabacum* y la cepa de *Agrobacterium* de la invención. Los métodos para cuantificar el porcentaje de necrosis (% de necrosis) se conocen bien en la técnica, y puede determinarse, por ejemplo, mediante la medición de las áreas de una o más hojas necróticas y las áreas totales de la una o más hojas que se han infiltrado por células de *Agrobacterium*.

Vector binario

Cualquier vector binario puede usarse dentro del método de la presente invención. En una modalidad preferida, un vector binario de tamaño mínimo (denominado además como vector binario mínimo) puede usarse en los métodos de la invención. Estos vectores binarios de tamaño mínimo se describen en la solicitud copendiente núm. EP11151187.9, presentada el 17 de enero de 2011, cuya descripción se incorpora en la presente descripción en su totalidad. Están específicamente diseñados para conducir la expresión transitoria de la secuencia codificante de una proteína o polipéptido, en particular una proteína o polipéptido heterólogos (que se ubica dentro de la región del T-ADN) en plantas de tabaco infiltradas. En la mayoría de las modalidades, los vectores binarios que pueden usarse en los métodos de la invención, no codifican proteínas virales o funciones virales, que facilitan la propagación sistémica o el movimiento de célula a célula de la secuencia en una planta infiltrada. En las secciones más adelante se describen detalles del vector.

Por lo tanto, la presente solicitud proporciona vectores para una transformación mediada por *Agrobacterium* en un método de acuerdo con la invención, particularmente ventajoso para la expresión de un ácido nucleico en una célula vegetal, particularmente para expresar una proteína o polipéptido en una célula vegetal, tejido vegetal o compartimento específico de una célula vegetal, para la producción de uno o más metabolitos u otros compuestos en una célula vegetal, o parte de una célula vegetal, para regular la expresión de un ácido nucleico, para la identificación de secuencias con función reguladora en una célula vegetal, para la identificación de la función de genes y ácidos nucleicos, de uno o más ácidos nucleicos exógenos o endógenos.

Los vectores binarios de tamaño mínimo, que se proporcionan en la presente descripción son particularmente ventajosos ya que tienen un tamaño mínimo, se mantienen establemente como un alto número de copias en una célula bacteriana, muy flexible y útil para múltiples propósitos y pueden usarse para la expresión transitoria así como la expresión de una secuencia heteróloga en una planta transgénica estable o célula vegetal.

El vector binario de tamaño mínimo que puede usarse dentro del método de la presente invención puede comprender, consistir, o consistir esencialmente de los siguientes elementos de ácido nucleico:

a) un primer elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección que es funcional en especies de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*;

b) un segundo elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación que es funcional en *Escherichia coli*;

c) un tercer elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación;

d) un cuarto elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de un segundo origen de replicación, que es diferente del primer origen de replicación y que es funcional en *Agrobacterium*; y

e) un quinto elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de una región de T-ADN que comprende una secuencia del borde derecho del T-ADN y una secuencia del borde izquierdo del T-ADN de un plásmido de *Agrobacterium tumefaciens* inductor de tumores o un plásmido inductor de raíces de *Agrobacterium rhizogenes*;

en donde los elementos de ácido nucleico anteriores se proporcionan en una molécula polinucleotídica circular y están separados por secuencias de nucleótidos hueco que no tienen una función en la replicación, el mantenimiento o la transferencia de ácido nucleico, y en donde dichas secuencias de nucleótidos hueco representan menos del 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, del tamaño total del vector. Preferentemente, las secuencias de nucleótidos hueco representan menos del 20 % del tamaño total del vector.

En una modalidad específica de la invención, un vector binario de tamaño mínimo puede usarse en el método de acuerdo con la presente invención, en donde

(i) la secuencia del borde izquierdo del T-ADN y la secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección (a) están separadas por una primera secuencia de nucleótidos hueco de no más de 300 pb;

(ii) la secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección (a) y la secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación (b) están separadas por una segunda secuencia de nucleótidos hueco de no más de 200 pb;

(iii) la secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación (b) y la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación (c) están separadas por una tercera secuencia de nucleótidos hueco de no más de 200 pb;

(iv) la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación (c) y la secuencia de nucleótidos de un segundo origen de replicación (d) están separadas por una cuarta secuencia de nucleótidos hueco de no más de 500 pb; y

(v) la secuencia de nucleótidos de un segundo origen de replicación (d) y la secuencia del borde derecho del T-ADN están separadas por una quinta secuencia de nucleótidos hueco de no más de 150 pb.

En determinadas modalidades de la invención, el vector binario de tamaño mínimo para usar en el método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes tiene un tamaño total de menos de 5900 pb, menos de 5500 pb, menos de 5200 pb, o menos de 5100 pb, pero especialmente un tamaño total de 5150 pb.

En otra modalidad específica de la invención, se proporciona un vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en el párrafo precedente, en donde los elementos de ácido nucleico (a) a (e) están dispuestos linealmente uno con respecto al otro en la molécula vector en el orden indicado en la primera modalidad de la invención, es decir, (a)(b)(c)(d)(e).

Un experto en la técnica será capaz fácilmente de generar un vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes que comprenda una cadena principal con un orden diferente de los elementos de ácido nucleico a) a e) según se define en cualquiera de las modalidades precedentes.

En consecuencia, en una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde izquierdo del T-ADN. En una modalidad específica, el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) y la secuencia del borde izquierdo del T-ADN están separadas por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 300 pb.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde derecho del T-ADN. En una modalidad específica, el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) y la secuencia del borde derecho del T-ADN están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 150 pb.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) se ubican de manera proximal con respecto a la secuencia del borde izquierdo del T-ADN y la secuencia del borde derecho del T-ADN, respectivamente.

En una modalidad específica de la invención, se proporciona la molécula vector de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde, el primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) no están adyacentes inmediatamente uno con respecto al otro y al menos otro elemento funcional del vector separa el primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d).

En una modalidad específica de la invención, el primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) se seleccionan del grupo que consiste en Col E1 ori y RK2 oriV, respectivamente.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde izquierdo del T-ADN y el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde derecho del T-ADN.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde derecho del T-ADN y el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d) se ubica de manera proximal con respecto a la secuencia del borde izquierdo del T-ADN.

En una modalidad de la invención, se proporciona la molécula vector de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) no están adyacentes inmediatamente uno con respecto al otro y al menos otro elemento funcional del vector separa el primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d).

En otra modalidad, el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación (b) o segundo origen de replicación (d) y la secuencia del borde izquierdo del T-ADN están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 300 pb. Aún en otra modalidad, el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación (b) o segundo origen de replicación (d) y la secuencia del borde derecho del T-ADN están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 150 pb.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde los elementos de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y segundo origen de replicación (d) están adyacentes uno con respecto al otro y se ubican de manera proximal con respecto a la secuencia del borde izquierdo del T-ADN. En una modalidad específica, se proporciona un vector binario de tamaño mínimo según se define en cualquiera de las modalidades precedentes en donde el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) o la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d) y la secuencia del borde izquierdo del T-ADN están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 300 pb y los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 200 pb.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde los elementos de ácido nucleico que comprenden las secuencias de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) están adyacentes uno con respecto al otro y se ubican de manera proximal con respecto a la secuencia del borde derecho del T-ADN. En una modalidad específica de la invención, se proporciona un vector binario de tamaño mínimo según se define en cualquiera de las modalidades precedentes en donde el elemento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) o la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d) y la secuencia del borde derecho del T-ADN están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 150 pb y los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y el segundo origen de replicación (d) están separados por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 500 pb.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación (c) está flanqueado por los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d).

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) está flanqueado por los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d). En una modalidad específica, los elementos de ácido nucleico flanqueantes que comprenden la secuencia de nucleótidos del primer origen de replicación (b) y la secuencia de nucleótidos del segundo origen de replicación (d) están separados de los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación (c) o los elementos de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* (a) por una secuencia de nucleótidos hueco de no más de 200 pb y 500 pb, respectivamente.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (a) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección funcional en una célula de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*. El marcador de selección puede ser uno de resistencia a antibióticos, particularmente resistencia a un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, gentamicina, espectinomycin, bleomicina, fleomicina, rifampicina, estreptomycin y blastidina S.

En determinadas modalidades de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (b) comprende una secuencia de nucleótidos de un primer origen de replicación funcional en *Escherichia coli* seleccionado del grupo que consiste en un origen de replicación ColE1, un origen de replicación que pertenece al grupo de incompatibilidad ColE1; un origen de replicación pMB1, y un origen de replicación que pertenece a cualquiera del grupo de incompatibilidad FI, FII, FIII, FIV, I J, N, O, P, Q, T, o W.

En una modalidad específica de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (b) comprende el ácido nucleico de un origen de replicación ColE1. El origen de replicación ColE1 puede obtenerse, por ejemplo, a partir de un vector pBluescript (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos).

En otra modalidad específica de la invención, la invención proporciona un vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes en donde el elemento de ácido nucleico (b) comprende el ácido nucleico de un origen de replicación pMB1. El origen de replicación pMB1 y codifica dos ARN, ARNI y ARNII y una proteína conocida como Rom o Rop. Por ejemplo, el origen de replicación pMB1 puede ser el de un vector pGEM (Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos) o un vector pUC tal como, pero sin limitarse a, pUC8 (GenBank: L08959.1) y que resulta en un alto número de copias.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (c) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de iniciación de la replicación que es una proteína de iniciación de la replicación RK2 TrfA.

En determinadas modalidades de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (d) comprende una secuencia de nucleótidos de un segundo origen de replicación, que es diferente del primer origen de replicación y es funcional en *Agrobacterium*, y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en un origen de replicación oriV mínimo, RK2 oriV, y un origen de replicación que pertenece a cualquiera del grupo de incompatibilidad FI, FII, FIII, FIV, I J, N, O, P, Q, T, o W.

En una modalidad de la invención, se proporciona la molécula vector de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el segundo elemento de ácido nucleico b) o el cuarto elemento de ácido nucleico d) es el origen de replicación (oriV) y el tercer elemento de ácido nucleico c) es la proteína de iniciación de la replicación TrfA del plásmido RK2 de amplia variedad de huéspedes, funcional en *Escherichia coli* y *Agrobacterium* spp. (Schmidhauser y Helinski (1985). J. Bacteriol. 164: 446-455).

En una modalidad de la invención, se proporciona la molécula vector de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el quinto elemento de ácido nucleico e) comprende dos secuencias bordes de T-ADN, es decir una secuencia del borde izquierdo del T-ADN y una secuencia del borde derecho del T-ADN.

En determinadas modalidades de la invención, el elemento de ácido nucleico e) comprende una secuencia de un borde del T-ADN de una cepa de *Agrobacterium* spp. de la familia de la nopalina, que es capaz de catalizar la nopalina, ácido nopalínico, leucinopina, glutaminopina o succinamopina.

En modalidades alternativas de la invención, el elemento de ácido nucleico e) comprende una secuencia de un borde del T-ADN de una cepa de *Agrobacterium* de la familia de la octopina, que es capaz de catalizar la octopina, ácido octopínico, lisopina o histopina. En otras determinadas modalidades de la invención, el elemento de ácido nucleico e) comprende una secuencia de un borde del T-ADN de una cepa de *Agrobacterium* de la familia de manitilo que cataliza la manopina, ácido manopínico, agropina o ácido agropínico.

En una modalidad de la invención, se proporciona el vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el elemento de ácido nucleico (e) que comprende una secuencia de nucleótidos de una región de T-ADN que comprende una secuencia del borde derecho del T-ADN y una secuencia del borde izquierdo del T-ADN de un plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido inductor de raíces de *Agrobacterium rhizogenes* contiene al menos un sitio de escisión único de endonucleasas de restricción, particularmente al menos dos, tres, cuatro, o cinco sitios de escisión únicos de endonucleasas de restricción.

El sitio de escisión de endonucleasas de restricción puede ser un sitio de escisión seleccionado del grupo que consiste en AatII, Acc65I, AclI, AflII, AflIII, AhdI, AhoI, ApaBI, ApaI, AseI, AsiSI, AvrII, BaeI, BamHI, BanII, Bbr7I, BbsI, BbvCI, BfrBI, BplI, BmtI, BpII, Bpml, Bpu10I, BsaAI, BsaI, BsaXI, BsiWI, BspEI, BsrGI, BstAPI, BstBI, BstZ17I, Bsu36I, DraIII, EcoICRI, EcoNI, EcoRI, Fall, FseI, FspAI, HindIII, HpaI, KpnI, M.AclI, M.AflIII, M.AloI, M.ApaI, M.BaeI, M.BanII, M.BbvCIA, M.BbvCIB, M.BnaI, M.BsaAI, M.BstI, M.BstVI, M.DraIII, M.EcoAI, M.EcoKI, M.EcoR124I, M.HindIII, M.HpaI, M.KpnBI, M.KpnI, M.MunI, M.PaeR7I, M.PhiBssHII, M.PshAI, M.Rrh4273I, M.SacI, M.Sall, M.Sau3239I, M.SnaBI, M.Tth111I, M.VspI, M.XbaI, M.XhoI, MfeI, MluI, NheI, NruI, NsiI, PciI, PmlI, Ppu10I, PshAI, PspOMI, PstI, RsrII, SacI, Sall, SanDI, SapI, ScI, SnaBI, SrfI, SwaI, Tth111I, XbaI, XhoI, XmnI y ZraI. Tales sitios de escisión pueden acomodar la inserción de cualquier ADN (tal como un casete de expresión) que comprende un extremo 5' compatible, un extremo 3' compatible, o uno o dos extremos romos.

En una modalidad, dicho casete de expresión comprende un elemento regulador que es funcional en una planta, particularmente una planta del género *Nicotiana*, y una secuencia de nucleótidos de interés.

El experto en la técnica puede eliminar fácilmente un sitio de reconocimiento de endonucleasas que corta una vez, o más, mediante una mutación o alteración de uno o más pares de bases del ácido nucleico que comprende dicho sitio de reconocimiento sin alterar las propiedades del vector. Se apreciará que cualquier sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción que se encuentre fuera de una secuencia codificante, secuencia reguladora u otra secuencia con una función esencial para el vector, puede alterarse sin afectar las propiedades y la función del vector. Similarmente, se apreciará que se puede mutar una secuencia comprendida dentro de un fragmento que codifica para una proteína sin alterar la función de dicha proteína mediante la introducción de una mutación silenciosa. Se apreciará que un experto en la técnica podría no necesitar un sitio de restricción único o algún sitio de restricción o combinación de sitios con propósitos de clonación ya que una secuencia de ácido nucleico para la expresión en una célula vegetal, o cualquier otra secuencia de ácido nucleico, también puede incorporarse directamente en la región de T-ADN del vector o en otro lugar mediante el diseño y la síntesis química junto con los elementos de ácido nucleico a) a e) de la molécula vector de acuerdo con la invención y como se define en cualquiera de las modalidades anteriores sin la necesidad de usar endonucleasas de restricción.

La invención proporciona además un vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la invención, en donde el quinto elemento de ácido nucleico (e) comprende además, entre la secuencia del borde derecho del T-ADN y la secuencia del borde izquierdo del T-ADN, un elemento regulador que es funcional en una planta o célula vegetal transformadas y que se unirá operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto de interés cuando dicha secuencia de nucleótidos se inserte en la molécula vector. Tales moléculas vectores pueden usarse fácilmente para la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés. Los uno o más sitios de escisión por restricción únicos pueden estar presentes entre el elemento regulador y una de las secuencias de un borde del T-ADN para facilitar la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés. En consecuencia, en determinadas modalidades la invención proporciona además un vector binario de tamaño mínimo para usar en un método de acuerdo con la invención, en donde el quinto elemento de ácido nucleico (e) comprende además, entre las secuencias del borde derecho y el borde izquierdo del T-ADN, un elemento regulador que es funcional en una célula vegetal y que se une operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés.

En diversas modalidades de la invención, el elemento regulador que está presente en la región de T-ADN es un promotor seleccionado del grupo que consiste en el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor modificado de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor doble de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor mínimo de 35 S, promotor de la nopalina sintasa, un promotor del virus del mosaico del caupí, un promotor de HT-CPMV, un promotor de CPS2p de la copalil sintasa de tabaco, un promotor de dihidrinina, un promotor de plastocianina, un promotor de 35S/HT-CPMV, y muchos otros promotores que se derivan de caulimovirus, tales como, pero sin limitarse a, virus del mosaico de Mirabilis (MMV), virus del mosaico de escrofularia (FMV), virus del rayado clorótico del cacahuete (PCLSV), promotor doble de 35S CaMV (35Sx2), promotor doble de MMV (MMVx2), y promotor doble de FMV (FMVx2).

En determinadas modalidades de la invención, la secuencia de nucleótidos bajo el control de un elemento regulador de plantas codifica un marcador de selección que es funcional en una célula vegetal, particularmente un marcador de selección seleccionado de un grupo que consiste en resistencia a antibióticos, resistencia a herbicidas y una proteína o polipéptido reporteros que producen características identificables visualmente.

El marcador de selección en plantas presente en un vector binario para usarse dentro del método de la presente invención, particularmente de un vector binario de tamaño mínimo como se describe en el presente documento antes, puede ser un marcador que proporciona resistencia a un antibiótico aminoglucósido tal como kanamicina o neomicina, un herbicida tal como fosfinotricina o glufosinato. En la alternativa, el marcador de selección puede ser un marcador detectable tal como una proteína fluorescente que incluye pero no se limita a proteína fluorescente verde (GFP).

Sin embargo, para el propósito de la expresión transitoria, la utilidad de un marcador de selección para usar en plantas puede ser mínima y puede omitirse del vector. Esto permite una reducción adicional significativa del tamaño del vector. Por ejemplo, como se muestra en la sección de ejemplos 1,3, pPMP1 se construyó mediante la eliminación del gen de la neomicina fosfotransferasa derivado de pBIN61 (nptII) que codifica la resistencia a la kanamicina de pC100. Por lo tanto, pPMP1 es un ejemplo de un vector de la invención que carece de un marcador de selección en plantas.

En consecuencia, en una modalidad de la invención, se proporciona la molécula vector de acuerdo con la presente invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el gen marcador de selección en plantas está ausente o se ha omitido.

Como se ejemplifica en el Ejemplo 2, la presente invención proporciona además un vector binario mínimo de menos de 5,150 pares de bases que comprende una cadena principal mínima y una región de T-ADN que sin afectar la replicación y el mantenimiento estable en una célula bacteriana puede mantenerse como un plásmido con alto número de copias en *Escherichia coli* y *Agrobacterium* spp., que puede usarse dentro de un método de acuerdo con la invención. La secuencia del vector binario pPMP1 mínimo se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 1.

En consecuencia, en una modalidad, la presente invención contempla el uso de una molécula vector que tiene una secuencia polinucleotídica que es al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia polinucleotídica como se representa en la sec. con núm. de ident.: 1 y en donde los elementos de ácido nucleico (a) a (e) muestran la misma funcionalidad que los elementos de la contraparte proporcionados en la sec. con núm. de ident.:1, en un método de acuerdo con la presente invención.

Los vectores de la presente invención y los elementos de ácido nucleico a) a e) según se definen en cualquiera de las modalidades precedentes y comprendidos dentro de tales vectores pueden ser secuencias de ácido nucleico de origen natural unidas covalentemente en un plásmido circular de ADN, o secuencias de ácido nucleico sintetizadas químicamente, o una mezcla de estas. Cuando se sintetizan químicamente, los elementos de ácido nucleico a) a e) pueden basarse en secuencias de ácidos nucleicos y proteínas o polipéptidos de origen natural de bacterias u otros organismos de interés, y muestran la misma funcionalidad que las secuencias de origen natural.

En una modalidad específica, la molécula vector tiene una secuencia polinucleotídica como se representa en la sec. con núm. de ident.: 1.

El uso de pPMP1 y derivados de este dio como resultado una buena expresión estable y transitoria de ácidos nucleicos, proteínas o péptidos en las células vegetales transformadas de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana* como se ejemplifica en el Ejemplo 10. Además, la transformación con pPMP1 y los derivados de este tales como el vector binario mínimo de pC100 seleccionable en plantas, dio como resultado preferentemente integraciones de una sola copia o de un bajo número de copias en el genoma nuclear de la planta y poca o ninguna integración de las secuencias de la cadena principal del vector.

Promotor/potenciadores/terminadores

Los vectores de expresión en plantas que son funcionales en una célula vegetal y pueden usarse dentro del método de la presente invención para conducir y/o controlar la expresión de un gen de interés en una planta de tabaco pueden contener además, si se desea, una región promotora reguladora (por ejemplo, una que confiere una expresión inducible o constitutiva, regulada ambientalmente o por el desarrollo, o específica de una célula o un tejido), un sitio de iniciación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación. Los elementos reguladores para usarse dentro del método de la invención pueden ser parte de un casete de expresión y estar presentes en una molécula vector, particularmente un vector binario, pero especialmente un vector binario de tamaño mínimo de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes como se describe en el presente documento, unidos operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés

En diversas modalidades de la invención, el elemento regulador está presente en la región de T-ADN de un vector binario, particularmente un vector binario de tamaño mínimo de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes como se describe en el presente documento. Los promotores preferidos para usar dentro del método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes son el promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor modificado de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor doble de 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor mínimo de 35 S, promotor de la nopalina sintasa, un promotor del virus del mosaico del caupí, un promotor de HT-CPMV, un promotor de CPS2p de la copalil sintasa de tabaco, un promotor de dihidrinina, un promotor de plastocianina, un promotor de 35S/HT-CPMV, y muchos otros promotores que se derivan de virus de ADN que pertenecen a la familia Caulimoviridae, ya sean los promotores de los transcritos de longitud completa (FLt) o los promotores de transcritos subgenómicos. Los ejemplos de tales virus de ADN incluyen, sin limitarse a, virus del mosaico de la coliflor (CaMV), virus del mosaico de Mirabilis (MMV), virus del mosaico de escrofularia (FMV), virus del rayado clorótico del cacahuete (PCLSV).

Para usar en un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes se prefieren particularmente los promotores de los transcritos de longitud completa (FLt) de virus de ADN que pertenecen a la familia Caulimoviridae que incluyen pero no se limitan a promotores de FMV, tales como los descritos en los documentos núms. WO1998000534 y US5994521, los promotores de MMV tales como los descritos en los documentos núms. US6420547 y US6930182 y los promotores de PCISV tales como los descritos en los documentos núms. WO1998005198, US5850019 y EP929211.

Muchos de tales promotores pueden modificarse mediante la unión de múltiples copias, por ejemplo dos copias, de su secuencia promotora en tándem para aumentar la actividad del promotor, tal como pero no se limitan a promotor doble de 35S de CaMV (35Sx2), promotor doble de MMV (MMVx2), promotor doble de FMV (FMVx2). Los fragmentos funcionales de estos promotores conocidos o descritos en las referencias citadas pueden usarse en el vector de la invención. Se han creado ejemplos específicos de tales promotores y se han incluido sitios de escisión para las enzimas de restricción EcoRI y HindIII en los extremos para facilitar la clonación en los vectores mínimos de la invención. Las secuencias de nucleótidos que son al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a estas secuencias y que son funcionales ya que permiten la expresión en plantas de la secuencia de nucleótidos unida operativamente también pueden usarse en los vectores de la invención.

En una modalidad específica de la invención, una o más de las siguientes secuencias promotoras pueden usarse dentro de un vector de acuerdo con la invención y como se describe en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes:

En una modalidad específica de la invención, una o más de las siguientes secuencias promotoras pueden usarse dentro de un vector de acuerdo con la invención y como se describe en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes:

> pMMV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcgtcaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctcctttgaagataagataataatggttgaagataagagtgggagcca
ccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccgcacagccacttgtgtgaagcatgagaagccgggtccctccact
aagaaaattagtgaaagcatcttccagtggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgtaagcca
tgacgtctaatacccaagaatttccttatataaggaacacaaatcagaaggaagagatcaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaa
tcaaaatcggaatcgaaatctctcatct**aagctt** (sec. con núm. de ident.: 9)

> pMMV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcgtcaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctcctttgaagataagataataatggttgaagataagagtgggagccc
ccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccgcacagccacttgtgtgaagcatgagaagccgggtccctccact
aagaaaattagtgaaagcatcttccagtggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgtaagcca
tgacgtctaatacccaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctcctttgaagataagataataatggttgaagataagagtggg
agccaccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccgcacagccacttgtgtgaagcatgagaagccgggtccct
ccactaagaaaattagtgaaagcatcttccagtggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgta

agccatgacgtctaatacccacaagaatttccttatataaggaacacaaatcagaaggaagagatcaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatctctcatct**aagctt** (Sec. con núm. de ident.: 10)

> pFMV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcgtcaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctacccaaaagca
tctttgcctttatttgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcc
cactcactaatgctgatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagattgcccgggtaatccctctatataagaaggcattcattocca
tttgaaggatcatcagatactcaaccaatatttctcactctaagaaattaagagctttgtattcttcaatgagggctaagaccc**aa**
gctt (Sec. con núm. de ident.: 11)

> pFMV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcgtcaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctacccaaaagca
tctttgcctttatttgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcc
cactcactaatgctgatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagattgcccacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaa
aaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctacccaaaagcattcttgcctttatttgcaaagataaagcagattcctctagtacaag
tggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagccactcactaatgctgatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagat
tgccgggtaatccctctatataagaaggcattcattccatttgaaggatcatcagatactcaaccaatatttctcactctaaga
aattaagagctttgtattcttcaatgagagggctaagaccc**aagctt** (Sec. con núm. de ident.: 12)

> pPCISV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcaatttcgtcaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgtgtgacctaaagcaataatggagccatgacgtaagggct
tacgcccatacgaataaattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatatttggcgtgtatttttaa
tttcacggcaatgacgatgtgacctgtgcacccgttgcctataaataagtttttagtttgattgatcgacacgatcgagaaga
cacggccat**aagctt** (Sec. con núm. de ident.: 13)

> pPCISV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

gaattcgtcaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgtgtgacctaaagcaataatggagccatgacgtaagggcttacgc
ccatacgaataaattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatgtttggcgtgtatttttaaatttcc
acggcaatgacgatgtgacccaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgtgtgacctaaagcaataatggagccatgacgt
aagggttacgcccatacgaataaattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatatttggcgtgtat
ttttaatttccacggcaatgacgatgtgacctgtgcacccgttgcctataaataagtttttagtttgattgatcgacacggtc
gagaagacacggccat**aagctt** (Sec. con núm. de ident.: 14)

Dos series de vectores derivados de pC100 se crearon mediante inserción de un promotor FLT de uno de estos virus de ADN de la familia Caulimoviridae en la región de T-ADN. La Figura 7 muestra la región de T-ADN de una serie de nueve vectores, es decir pC141, pC190, pC191, pC192, pC193, pC241, pC242, pC243, y pC265. El sitio de clonación múltiple presente corriente abajo del promotor FLT en estos vectores permite la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés para la expresión en células vegetales, particularmente células vegetales de plantas del género *Nicotiana*, particularmente *Nicotiana tabacum*. Una segunda serie de vectores pequeños se creó mediante la eliminación del casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al marcador de selección en plantas (nptII) mediante la digestión de cada uno de los vectores en la primera serie con SpeI y AvrII, y la recircularización del plásmido. Estos vectores, es decir pC277, pC278, pC279, pC280, pC281 y pC282, son particularmente adecuados para la expresión transitoria de un polipéptido de interés en células vegetales o plantas, particularmente plantas del género *Nicotiana*, particularmente *Nicotiana tabacum*. En consecuencia, el vector binario de la invención como se describe en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes puede comprender en su región de T-ADN, una o dos o más copias de un promotor FLT de un virus de ADN de MMV, FMV o PCISV, (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14) y opcionalmente un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección en plantas.

En una modalidad de la invención, un vector para expresar la secuencia génica del polipéptido heterólogo, particularmente un vector binario, pero especialmente el vector binario de tamaño mínimo como se describe en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes puede comprender una o más secuencias reguladoras, en este caso regiones no traducidas derivadas de virus del mosaico del caupí (HT-CPMV; WO 07/135480). Preferentemente, el vector binario comprende además el promotor mínimo de 35S de CaMV. El sistema HT-CPMV se basa en un promotor mínimo, una región 5' -UTR modificada, que contiene elementos hipertraducibles (HT), y la región 3' -UTR del ARN-2 de CPMV que permite una traducción mejorada y alta acumulación de proteínas recombinantes en plantas.

promotor mínimo de 35S-CaMV (sec. con núm. de ident.: 2)

gaaacctcctcggattccattgccagctatctgtcactttattgagaagatagtggaaggaaggtggctcctacaaatgccat
cattgcgataaaggaaagggccatcgttgaagatgcctctgccgacagtgggtccaaagatggacccccacccacgaggagcatcgt
ggaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcacaatccc
actatccttcgcaagacccttcctctatataaggaagttcatttcatttggagagg

5' UTR HT-CPMV (sec. con núm. de ident.:3)

tattaaaatcttaataggttttgataaaagcgaacgtgggaaacccgaaccaaactctctctcatctctctta
aagcaaacttctctctgtctttcttgctgagcgatcttcaacgttgcagatcgtgcttcggcaccagtacaacgttttctttc
actgaagcgaatcaaagatctctttgtggacacgtagtgcggcgccattaaataacgtgtacttgtcctattcttgcggtgtgg
tcttgggaaaagaaagccttgctggaggtgctgttcagcccatatacttactgttacgattctgctgacttctcgcggtgcaat
atctctacttctgcttgacgaggtattgttgctgtacttcttcttcttcttcttctgctgattgggtctataagaaatctagtatt
ttcttgaacagagttttcccggtggttttgaacttgagaaagattgttaagcttctgtatattctgccccaaatttgcggggc
c

3' UTR HT-CPMV (sec. con núm. de ident.: 4)

atcttctttagtttgaatttactgttattcgggtgtgcatttctatgtttggtgagcggtttctgtgctcagagtgtgtttatctt
atgtaatttaatttcttctgtgagctcctgttttagcaggtgcgtccctcagcaaggacacaaaaagattttaattttattaaaaaa
aaaaaaaaagaccggg

La secuencia promotora puede consistir en elementos corriente arriba proximales y más distales, los últimos
elementos frecuentemente se denominan potenciadores. En consecuencia, un "potenciador" es una secuencia de
ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento
heterólogo insertado para aumentar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Es capaz de funcionar en
ambas orientaciones (normal o invertida), y es capaz de funcionar aún cuando se mueve corriente arriba o corriente
abajo del promotor. Tanto a los potenciadores como a otros elementos promotores corriente arriba se unen
proteínas de unión al ADN específicas de secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden originarse en
su totalidad a partir de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos, derivados de diferentes
promotores de origen natural, o aún estar constituidos de segmentos sintéticos de ADN. Un promotor puede
contener además secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteicos que controlan la
eficacia de la iniciación de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o del desarrollo.

Los ejemplos de potenciadores incluyen elementos del promotor de 35S de CaMV, genes de octopina sintasa (Ellis y
otros, 1987), el gen de actina 1 del arroz, el gen de la alcohol deshidrogenasa de maíz (Callis 1987), el gen shrunken
1 del maíz (Vasil 1989), potenciadores de la traducción omega del virus del grabado del tabaco (TEV) y virus del
mosaico del tabaco (TMV) (Gallie 1989) y promotores de eucariotas no vegetales (por ejemplo levaduras; Ma 1988).
Los vectores para usar de acuerdo con la presente invención pueden construirse para incluir un elemento
potenciador de este tipo. El uso de un elemento potenciador, y particularmente múltiples copias del elemento, puede
actuar para aumentar el nivel de transcripción de promotores adyacentes cuando se aplica en el contexto de la
transformación de plantas.

La región de terminación puede seleccionarse del grupo que consiste en una región de terminación de nopalina
sintasa (nos), proteína de reserva vegetativa (vsp), o inhibidor de proteinasa-2 (pin2).

Péptidos señal

Los vectores de expresión en plantas, particularmente los vectores binarios, y especialmente los vectores binarios de
tamaño mínimo de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes como se describe en el presente
documento, que son funcionales en una célula vegetal y pueden usarse dentro del método de la presente invención,
pueden comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que dirigen la proteína
recién expresada a una ubicación subcelular. Los péptidos señal que pueden usarse dentro de tales moléculas
vectores son, por ejemplo, los seleccionados de un grupo que consiste en una secuencia de orientación vacuolar,
una secuencia de orientación a cloroplastos, una secuencia de orientación a mitocondria, una secuencia que induce
la formación de cuerpos proteicos en una célula vegetal o una secuencia que induce la formación de cuerpos
oleosos en una célula vegetal.

En una modalidad de la invención, la secuencia de orientación es un péptido señal para importar una proteína hacia
el retículo endoplásmico. Los péptidos señal son péptidos transitorios que se ubican en el extremo N-terminal de una
proteína y se escinden de manera cotraduccional durante la translocación a través de la membrana del retículo
endoplásmico. Un péptido señal que puede usarse en una molécula vector de acuerdo con la invención, sin limitarse
a ello, es el de origen natural en el extremo N-terminal de una secuencia de una cadena ligera o pesada de una IgG,
o el péptido señal de la patatina según se describe en los documentos núms. EP2002807566 y WO2007EP1606,
particularmente el péptido señal de la patatina de pC148 según se describe en el Ejemplo 9. Puede usarse cualquier
secuencia de nucleótidos que pueda codificar la secuencia del péptido señal de la patatina.

En una modalidad, una secuencia de nucleótidos que codifica al péptido señal de la patatina que consiste en: matktsflilffmilattsstca (sec. con núm. de ident.: 15)

5 puede usarse dentro de un vector de acuerdo con la invención y como se describe en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes.

Otros péptidos señal pueden predecirse, por ejemplo, mediante la herramienta de predicción SignalP (Emanuelsson y otros, 2007, Nature Protocols 2: 953-971).

10 En otra modalidad de la invención, la secuencia de orientación puede ser un péptido de retención en el retículo endoplásmico. Las secuencias de orientación de la retención en el retículo endoplásmico se encuentran en el extremo C-terminal de una proteína y pueden ser una secuencia de cuatro aminoácidos tal como KDEL, HDEL o DDEL, en donde K es lisina, D es ácido aspártico, E es ácido glutámico, L es leucina y H es histidina.

15 Aún en otra modalidad de la invención, la secuencia de orientación puede ser una secuencia que cuando se fusiona a una proteína da como resultado la formación de organelos de reserva no secretores en el retículo endoplásmico tales como, pero sin limitarse a, los descritos en los documentos núms. WO07/096192, WO06/056483 y WO06/056484. En determinadas modalidades de la invención, la secuencia de orientación puede ser una secuencia de orientación vacuolar, una secuencia de orientación a cloroplastos, una secuencia de orientación a mitocondrias o
20 cualquier otra secuencia cuya adición de lugar a una orientación específica de la proteína fusionada a ella al organelo específico dentro de la planta o célula vegetal.

En una modalidad, la molécula vector de acuerdo con la invención y según se define en cualquiera de las modalidades precedentes comprende además en la región de T-ADN un sitio de recombinación sitio específica para
25 una recombinación sitio específica. En una modalidad, el sitio de recombinación sitio específica se ubica corriente abajo del elemento regulador en plantas. En otra modalidad, el sitio de recombinación sitio específica se ubica corriente arriba del elemento regulador en plantas. En una modalidad específica de la invención, el sitio de recombinación es un sitio LoxP y parte de un sistema de recombinación sitio específica Cre-Lox. El sistema de recombinación sitio específica Cre-Lox usa una recombinasa cíclica (Cre) que cataliza la recombinación entre sitios
30 específicos (LoxP) que contienen sitios de unión específica para Cre.

En otra modalidad específica, el sitio de recombinación es un sitio de destino Gateway. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de interés se clonan primero en un “vector de entrada” disponible comercialmente y posteriormente se recombinan en un “vector de destino”. El vector de destino puede usarse para el análisis de la actividad del
35 promotor de una secuencia de ácido nucleico dada o un número de secuencias, para el análisis de la función, para la localización de proteínas, para la interacción entre proteínas, para el silenciamiento de un gen dado o para experimentos de purificación por afinidad. La tecnología de clonación Gateway puede adquirirse de Invitrogen Inc., Estados Unidos.

40 Supresor del silenciamiento génico

En diversas modalidades, la variedad de tabaco seleccionada para usar en los métodos de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes puede comprender un supresor del silenciamiento génico, particularmente un
45 supresor del silenciamiento génico de origen viral, y particularmente un supresor del silenciamiento génico de un potyvirus o un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la necrosis del pepino (CNV), virus del río Havel (Harv), virus latente de la pera (PELV), virus de necrosis de lisianthus, virus latente argelino de la vid, virus de las manchas necróticas de Pelargonium (PeNSV), virus de la mancha anular de Cymbidium (CymRSV), virus del rizado moteado de la alcachofa (AMCV), virus de la mancha anular del clavel italiano (CIRV), virus del enanismo/necrosis de la lechuga, virus del moteado amarillo del arroz (RYMV), virus X de la papa (PVX), virus Y de la papa (PVY),
50 Virus del mosaico africano de la yuca (ACMV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus del grabado del tabaco (TEV) o virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV).

En otra modalidad dicho supresor del silenciamiento génico se selecciona del grupo que consiste en la proteína p19 del virus de la necrosis del pepino (CNV), la proteína p1 del virus del moteado amarillo del arroz (RYMV), la proteína
55 p25 del virus X de la papa (PVX), la proteína AC2 del virus del mosaico africano de la yuca (ACMV), la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) y la proteinasa del componente asistente (HcPro) del virus del grabado del tabaco (TEV).

Descripciones detalladas de supresores del silenciamiento génico que incluyen HcPro se proporcionan en los
60 documentos núms. WO98/44097, WO01/38512, y WO01/34822. Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica HcPro, se proporciona en la presente descripción según se expone en la sec. con núm. de ident.: 5. y se denomina además como P1-HcPro-P3. Esta secuencia puede insertarse en un vector binario conocido en la técnica o un vector binario de tamaño mínimo de la invención. En consecuencia, en un ejemplo no limitante, la secuencia génica expresable de HcPro comprende la siguiente secuencia o un fragmento de esta que es funcional para
65 aumentar el rendimiento de una proteína heteróloga en plantas de tabaco.

P1-HcPro-P3 (sec. con núm. de ident.: 5)

atggcactcatcttttggcacagtcaacgctaacatcctgaaggaagtgttcggtggagctcgtatggcttgcgttaccagcgcaca
 tatggctggagcgaatggaagcattttgaagaaggcagaagagacctctcgtgcaatcatgcacaaaccagtgatcttcggagaag
 5 actacattaccgaggcagacttgcccttacacaccactccatttagaggtcgatgctgaaatggagcggatgtattatcttggtcgt
 cgcgcgtcacccatggcaagagacgcaaagtttctgtgaataacaagaggaacaggagaaggaaagtggccaaaacgtacgtggg
 gcgtgattccattgttgagaagattgtagtgtcccccacacgagagaaaaggttgataccacagcagcagtggaagacatttgcaatg
 aagctaccactcaacttgtgcataatagtatgccaaagcgtgaagaagcagaaaaacttcttggccgccacttactaagtaacgtg
 10 tatgcccaaacttggagcatagtgcgcaaagcccatatgcaggtggagatcatttagcaagaagagcgtccgagcggaggtcaagag
 atttgagggctcgggtgcaattgttcgcaagtgtgcgtcacatgtatggcgagaggaaaaggggtggacttacgtattgacaactggc
 agcaagagacactttagaccttgctaaaagatttaagaatgagagagtgatcaatcgaagctcacttttggttcaagtggccta
 gttttgaggaaggtcgtacggacctgcgcatttggtatcgacatggtatgttcattgtacgcgggtcggtcggatgggatgttggg
 ggtatgctcgtgcgaaggttaacgttcgtgtttgtcactcaatgacacattatagcgaccatcaccatcaccatcagcgtccgcaca
 aatcaatctctgaggtcattcttcatcaccatactctaagaaattcttggagttgagaccagatggaatctcccatgagtgtgacaaga
 15 ggagtatcagttgagcgggtgcgggtgaggtggctgcaatcctgacacaagcactttcccggtgtggaatgacatgcaaacgttg
 catggttgaaacacctgacattgttgaggggtgagtcgggaggaagtgtcaccaaccaaggtaagctcctagcaatgctgaaagaac
 agtatccagattttcccaatggccgagaaactactcacaaggtttttgcaacagaaatcactagtaaatcaaaatttgacagcctgc
 gtgagcgtcaaaacaactcatttggtgaccgcaaaacagctccattcacacacgtactggctgtcagcgaaattctgtttaaaggcaa
 taaactaacagggggccgatctcgaagaggcaagcacacatatgcttgaaatagcaaggttcttgaacaatcgactgaaaatgtgc
 20 gcatgtggccaccttgggttctttcagaataaaaatctcatogaaggcccatgtgaataacgcactcatgtgtgataatcaacttgat
 cagaatgggaattttatttggggactaaggggtgcacacgcaaagaggttctttaaaggatttttactgagattgacccaaatga
 aggatacgataagtatgttatcaggaacatatcaggggtagcagaaagctagcaattggcaatttgataatgtcaactgacttcc
 agacgctcaggcaacaaattcaaggcgaaactattgagcgtaaagaaattgggaatcactgcatttcaatgcggaatggttaattac
 gtgtacccatgttgtgtgttactcttgaagatggttaaggctcaatattcggatctaaagcatccaacgaagagacatctggtcat
 25 tggcaactctggcgattcaaagtacctagaccttccagttctcaatgaagagaaaaatgtatatagctaataaggttattgtctaca
 tgaacattttcttctgtctactagtgaatgtcaaggaagaggatgcaaggacttcaccaagtttataagggaacacaattgttcca
 aagcttggagcgtggccaacaatgcaagatgttgcaactgcatgctacttactttccattctttaccacagatgtcctgagtgctga
 attaccacagaatttttggttgatcatgacaacaaaacaatgcatgttttgattcgtatgggtctagaacgacaggataccacatgt
 tgaatgaacacacacatcccagctaattgaattcgttcatcaggttgggaatccgaaatgaaaacttacaatgttggagggtatg
 30 aaccgagatatggtcacacaaggtgcaattgagatgttgatcaagtcctatacaaacacatctcatgaagcagttacttgagga
 ggagccatacataattgtcctggcaatagtctcccttcaatttttaattgccaatgtacaactctggaacttttgagcagggcgttac
 aaatgtggttgccaaatacaatgaggttagctaacctcgtgccatcttgtcagcettggcgcaaaagttaactttggcagacttg
 ttcgtccagcagcgttaatttgattaatgagtatgpcaggttaattttgacaatctgattgacggtgtcaggggtaaccattcgct
 atccctagcaatggaaattgttactattaagctggccaccaagagatggacatggcgttgaggggaaggtggctatgctgtgacct
 35 ctgcagatcgttcaaacatttggcaataa

Proteína heteróloga

En diversas modalidades, la infiltración de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana*
 40 *tabacum* dentro de un método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes puede realizarse con una
 cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* que comprende una secuencia de nucleótidos expresable que
 codifica una proteína o polipéptido heterólogos seleccionados del grupo que consiste en factores de crecimiento,
 receptores, ligandos, moléculas de señalización; quinasas, enzimas, hormonas, supresores de tumores, proteínas
 45 de coagulación de la sangre, proteínas del ciclo celular, proteínas metabólicas, proteínas neuronales, proteínas
 cardíacas, proteínas deficientes en estados de enfermedad específicos, anticuerpos o un fragmento de estos,
 inmunoglobulinas, antígenos, proteínas que proporcionan resistencia a enfermedades, proteínas antimicrobianas,
 interferones, y citocinas. En diversas modalidades, la proteína o polipéptido heterólogo es una proteína o polipéptido
 humano, una proteína o polipéptido humano modificado, una proteína o polipéptido quimérico. En diversas
 modalidades, la proteína o polipéptido heterólogos no es una proteína o polipéptido de un patógeno vegetal, o más
 50 específicamente, no es una proteína o polipéptido de un patógeno vegetal fúngico, un patógeno vegetal viral, un
 patógeno vegetal bacteriano, un patógeno de especies de Solanaceae, un patógeno de *Nicotiana*, o un patógeno de
 tabaco.

La secuencia de nucleótidos expresable puede comprender una secuencia que se ha optimizado para la expresión
 55 en células vegetales, particularmente en células vegetales de plantas del género *Nicotiana*, particularmente
Nicotiana tabacum. Aunque la secuencia de nucleótidos expresable puede ser diferente de la secuencia codificante
 humana nativa, el aminoácido del producto traducido es idéntico. Uno o más codones en la secuencia de nucleótidos
 expresable se han sustituido con codones preferidos de acuerdo con el uso de codones conocidos de plantas,
 particularmente una planta del género *Nicotiana*, particularmente *Nicotiana tabacum*, que resulta en un patrón de
 60 codones preferidos que codifican el mismo aminoácido en una secuencia de nucleótidos expresable que permite el
 aumento de la expresión en planta o en planta de tabaco (con respecto al uso de la secuencia codificante nativa).
 Las técnicas para modificar una secuencia de nucleótidos con tales propósitos se conocen bien, ver por ejemplo, los
 documentos núms. US 5,786,464 y US 6,114,148.

65 En un aspecto, se usan secuencias codificantes de antígenos dentro del método de la invención como se describe
 en el presente documento en cualquiera de las modalidades precedentes que incluyen secuencias para inducir

respuestas inmunitarias protectoras (por ejemplo, como en una formulación vacunal). Tales antígenos adecuados incluyen pero no se limitan a antígenos microbianos (que incluyen antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de parásitos, y similares); antígenos de organismos multicelulares (tales como parásitos multicelulares); alérgenos; y antígenos asociados con patologías humanas o de animales (por ejemplo, tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, y similares). En un aspecto preferido, los antígenos virales incluyen, pero no se limitan a: antígenos de HIV; antígenos para inducir respuestas inmunitarias protectoras contra la influenza; antígenos de rotavirus; antígenos de ántrax; antígenos de la rabia; y similares. Los antígenos de vacunas pueden estar codificados como péptidos multivalentes o polipéptidos, por ejemplo, que comprenden diferentes o las mismas secuencias codificantes antigénicas repetidas en una construcción de expresión, y opcionalmente separadas por una o más secuencias enlazadoras.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos expresable codifica una cadena ligera de un anticuerpo, una cadena pesada de un anticuerpo, o tanto una cadena ligera como una cadena pesada de un anticuerpo. En una modalidad específica, la cadena pesada o cadena ligera es la de un anticuerpo que se une a CD20 humano. En otra modalidad específica, la cadena pesada o cadena ligera es la de un anticuerpo que se une a CD20 humano con el sitio de unión del anticuerpo de rituximab.

En diversas modalidades, la secuencia de nucleótidos expresable codifica una proteína o polipéptido heterólogos seleccionados del grupo que consiste en un antígeno del virus de influenza, particularmente una hemaglutinina (HA). Los virus de influenza son virus envueltos que salen a través de la membrana plasmática de células de mamíferos infectadas. Se clasifican en los tipos A, B, o C, en base a las nucleoproteínas y antígenos proteicos de la matriz presentes. Los virus de influenza tipo A pueden dividirse adicionalmente en 15 subtipos de acuerdo a la combinación de hemaglutinina (HA) y glicoproteínas de la superficie de neuraminidasa (NA) presentes. HA regula la capacidad del virus para unirse y penetrar en la célula huésped.

Actualmente, se reconocen 16 subtipos de HA (H1-H16). Cada virus de influenza de tipo A presenta un tipo de HA y un tipo de glicoproteína NA. La proteína HA que puede producirse por los métodos de la invención incluyen H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 o fragmento o porción de estas. Los ejemplos de subtipos que comprenden tales proteínas HA incluyen A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Indonesia/512006 (H5N1), A/pollo/Nueva York/1995, A/gaviota arenquera/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/pato real/MN/33/00, A/pato/Shanghai/1/2000, A/ánade del norte/TX/828189/02, A/pavo/Ontario/6118/68(H8N4), A/pato cuchara/Irán/G54/03, A/pollo/Alemania/N/1949(H10N7), A/pato/Inglaterra/56(H11N6), A/pato/Alberta/60176(H12N5), A/gaviota/Maryland/704/77(H13N6), A/pato real/Gurjev/263/82, A/pato/Australia/341/83 (H15N8), A/gaviota de cabeza negra/Suecia/5/99(H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburgo/66, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Islands Salomón 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malasia/2506/2004, B/Florida/4/2006, A/Singapur/1/57 (H2N2), A/Anhui/112005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), A/Teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). Se contempla que algunos de los virus de influenza que tienen uno de los subtipos H antes mencionados pueden causar una infección en humanos, y debido a su origen, pueden conducir a una pandemia. Por lo tanto muchos de los antígenos de estos subtipos (H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16) pueden usarse en una vacuna contra la influenza pandémica. Los subtipos H1, H2, H3 son los subtipos principales que están implicados en la infección de influenza en humanos y los antígenos de tales subtipos se contemplan para usar en una vacuna contra la influenza estacional.

Se contempla cualquier secuencia de nucleótidos que codifique una hemaglutinina de influenza o un fragmento inmunogénico de esta puede usarse en los métodos de la invención, de manera que el polipéptido de hemaglutinina o un fragmento de este se produzca en una variedad de *N. tabacum* hospedera. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias biológicas de hemaglutinina de influenza publicadas en bases de datos públicas, tales como Genbank (Nucleic Acids Research 1 de enero de 2004;32(1):23-6), o la base de datos Influenza Research Database (IRD; ver www.fludb.org o Squires y otros BioHealthBase: informatics support in the elucidation of influenza virus host pathogen interactions and virulence. Nucleic Acids Research (2008) vol. 36 (Database issue) pp. D497) puede usarse de acuerdo con la presente invención.

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga de interés se proporciona más adelante y se expone en la sec. con núm. de ident.: 8. Esta secuencia de nucleótidos codifica la hemaglutinina madura 5 de la influenza (H5) y los codones se han optimizado para la expresión de la secuencia en plantas. En consecuencia, la invención contempla vectores de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes según se describe anteriormente que comprenden, en la región de T-ADN y unida operativamente a un elemento regulador de plantas, una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina madura 5 de la influenza que muestra al menos 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 8.

HEI madura optimizada (H5)

```
atggagaaaatagtgcttcttcttgcataagtcagtccttggttaaaagtgcattggttaccatgcaacaattcaac
agagcaggttgacacaaatcatggaaaagaacgttactgttacacatgccaaagacatactggaaaagacacacaacgggaagctct
gcgatctagatggagtggaagcctctaattttaagagattgtagtgtgactggatggctcctcggaacccaatgtgtgacgaattc
```

atcaatgtaccggaatggtcttacatagtgagagaaggccaatccaaccaatgacctctgttaccagggagtttcaacgactatga
 agaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgagaaaattcaaatacatcccaaaagtcttgggtccgatcatgaagcct
 catcaggagtttagctcagcatgtccataacctgggaagtcctctcttttttagaaatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtaca
 taccacaataaaagaaaagctacaataataccaaccaagaggatcttttgggtactgtgggaattcaccatcctaataatgatgcggc
 5 agagcagacaaggctatatcaaaacccaaccacctatattccattgggacatcaacactaaaccagagattggtaccaaaaatag
 ctactagatccaaagtaaaccgggcaaaagtggaaggatggagttcttctggacaattttaaaacctaataatgatgcaatcaacttcgag
 agtaattggaatttcattgtctccagaatatgcatacaaaaattgtcaagaaaggggactcagcaattatgaaaagtgaattggaata
 tggtaactgcaacaccaagtggtcaaaactccaatggggcgataaaactctagtagccattccacaacatacacacctctcaccatcg
 10 ggggaatgccccaaatatgtgaaatcaaacagattagtccttgcaacagggtcagaaatagccctcaaaagagagagcagaagaaaa
 aagagaggactatttggagctatagcagggttttatagagggaggatggcagggaatggtagatgggttggtatgggtaccaccatag
 caatgagcaggggagtggttacgctgcagacaaagaatccactcaaaaggcaatagatggagtcaccaataagggtcaactcaatca
 ttgacaaaatgaacactcagtttgaggccgttggaagggaatttaataaacttagaaaggagaatagagaatttaaacagaagatg
 gaagacgggtttctagatgtctggaacttataatgccgaacttctggttctcatggaaaatgagagaactctagactttcatgactc
 15 aatgtttaagaacctctacgacaagggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggtaacggttggttcgagttctatc
 acaaatgtgataatgaatgtatggaaagtataagaaacggaacgtacaactatccgcagtattcagaagaagcaagattaaaaaga
 gaggaataagtggggtaaaattggaatcaataggaacttaccaataactgtcaatttattcaacagtggcgagttccctagcact
 ggcaatcatgatggctggtctatctttatggatgtgctccaatggatcggttacaatgcagaatttgcatttaa (sec. con núm.
 de ident.:8)

20 Preparación del inóculo y densidad celular

En una modalidad de la invención, pueden usarse diferentes cepas de *Agrobacterium* tales como bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la preparación del inóculo como se ejemplifica en el Ejemplo 1. Las cepas de *Agrobacterium* pueden comprender un vector binario que contiene el T-ADN con el gen de
 25 interés bajo el control de elementos reguladores en plantas, cultivadas hasta una $DO_{600} > 1,6$. Las cepas de *Agrobacterium* pueden recolectarse mediante centrifugación y resuspenderse en solución de infiltración a una densidad celular (DO_{600}) de al menos 2,1, al menos 2,4, al menos 2,7, al menos 3,0, al menos 3,3, al menos 3,6, al menos 3,8, al menos 3,9, al menos 4,0. En una modalidad específica, la DO_{600} de la solución de infiltración es > 2 .

30 En otra modalidad de la invención, las cepas de *Agrobacterium* también pueden diluirse en solución de infiltración y, como una medida opcional, puede añadirse acetosiringona para inducir virulencia.

En otras modalidades de la invención, pueden prepararse dos o más suspensiones de *Agrobacterium* de acuerdo con la presente invención y como se describe en el presente documento. Dichas dos o más suspensiones pueden
 35 después usarse separadamente para la infiltración de variedades, líneas de mejoramiento, o cultivares compatibles de *Nicotiana tabacum* o, en un enfoque alternativo, pueden mezclarse primero antes de la infiltración. Particularmente, una primera suspensión de *Agrobacterium* que alberga un primer vector binario con un primer gen expresable, por ejemplo una secuencia codificante que codifica una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos tales como los mencionados en la sección anterior, puede prepararse como se
 40 describe en el presente documento y mezclarse con una segunda suspensión de *Agrobacterium* que alberga un segundo vector binario con un segundo gen expresable, por ejemplo una secuencia codificante que codifica un supresor del silenciamiento génico.

45 En otra modalidad de la invención, el inóculo preparado como se describe en el presente documento puede almacenarse hasta una semana a 4-6 °C ante del uso.

Como se ejemplifica en los Ejemplos 11, 12 y 14, respectivamente, la invención proporciona además otras mejoras al método descrito anteriormente de preparación del inóculo que aumenta más aún el rendimiento general de los polipéptidos heterólogos.

50 En una modalidad de la invención, las agrobacterias se cultivan y después se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en una solución, preferentemente en una solución de infiltración, preferentemente a $DO_{600} > 2,0$, para generar un inóculo concentrado. Alternativamente, las agrobacterias se mantienen en medio de cultivo sin centrifugación y sin resuspensión. En una modalidad específica, las células de *Agrobacterium* que se cultivan para la
 55 infiltración se cultivan hasta una densidad óptica deseada sin selección con antibióticos. El inóculo puede usarse inmediatamente o almacenarse para su uso más tarde. En el día de la infiltración, diferentes inóculos concentrados que comprenden diferentes cepas de *Agrobacterium* como se describe en el presente documento o cepas idénticas de *Agrobacterium* que comprenden vectores binarios con diferentes secuencias codificantes de proteínas, pueden mezclarse juntos, a diferentes relaciones o combinaciones de relaciones, por ejemplo a una relación de 3:1, 1,67:1,
 60 1:3, 1:1 y después diluirse en la solución de infiltración hasta una DO_{600} final por definir. Por ejemplo, en una modalidad, la solución bacteriana puede tener una DO_{600} final de 0,32 o 0,85. Los inóculos pueden equilibrarse a temperatura ambiente durante un período por definir, por ejemplo, 30 minutos. Los inóculos pueden diluirse secuencialmente a DO_{600} en la solución de infiltración para obtener densidades bacterianas menores.

En una modalidad preferida de la invención, la cepa de *Agrobacterium*, tal como AGL1, puede albergar un gen o construcción genética, por ejemplo un gen reportero, por ejemplo tGFP, o un supresor del silenciamiento, por ejemplo HcPro.

- 5 En una modalidad preferida de la invención, la cepa de *Agrobacterium* es AGL1, la DO final del inóculo es 0,7, la relación de células AGL1 que comprenden un gen de interés expresable frente a células AGL1 que comprenden una secuencia expresable de HcPro en el inóculo es 2,5 a 1, y la variedad de *Nicotiana tabacum* es PM132,

Infiltración de plantas

- 10 Una vez se ha identificado una combinación compatible de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* y una cepa de *Agrobacterium* según se describió anteriormente. Puede usarse cualquier método conocido de infiltración en plantas dentro del método de acuerdo con la invención, tal como, pero sin limitarse a, suministro mediante cañón de partículas de una molécula de ácido nucleico que comprende el gen que codifica para una proteína deseada de una manera expresable, suministro mediado por *Agrobacterium* de un vector binario que comprende el gen expresable, electroporación de protoplastos, y suministro mediado por polietilenglicol de ADN desnudo en protoplastos vegetales. El bombardeo de partículas usualmente solo alcanza unas pocas células y el ADN debe llegar al núcleo celular para llevar a cabo la transcripción, y por lo tanto no es muy eficaz para la expresión transitoria.

- 20 El uso de *Agrobacterium* suministrado mediante infiltración (agroinfiltración) puede suministrar genes extraños en un número de células significativamente mayor. El sistema original de infiltración por *Agrobacterium* para la expresión transitoria se describió por Kapila y otros, Plant Sci. 122: 101-108 (1997) y se desarrolló para el análisis rápido de la funcionalidad de una proteína que se pensaba que sería útil para la resistencia a enfermedades del tejido vegetal.

- 25 En diversas modalidades de la invención, se proporcionan sistemas para tratar plantas completas intactas, particularmente plantas completas e intactas o partes de plantas tales como los órganos de la planta o tejidos vegetales que se han puesto en contacto con células de *Agrobacterium*, mediante la exposición a presión atmosférica baja o al vacío. Los sistemas usados en el método de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cámara para recibir una planta completa, particularmente una planta completa e intacta o una parte de una planta tal como un órgano de una planta o tejido vegetal, o una pluralidad de tales plantas completas o partes de plantas, y un medio para crear un ambiente de baja presión de un fluido y opcionalmente suministrar presión negativa o positiva en el fluido, o una combinación de presión negativa y positiva en el fluido.

- 35 En una modalidad de la invención, se proporcionan sistemas para tratar plantas completas intactas, particularmente plantas completas e intactas o partes de plantas tales como órganos de plantas o tejidos vegetales que se han puesto en contacto con células de *Agrobacterium* tras la exposición a una baja presión atmosférica o al vacío. Los sistemas usados en el método de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cámara para recibir una planta completa, particularmente una planta completa e intacta o una parte de una planta tal como un órgano de una planta o tejido vegetal, o una pluralidad de tales plantas completas o partes de plantas, y un medio para crear un ambiente con baja presión en un fluido y opcionalmente suministrar presión positiva al fluido.

- 45 En otra modalidad, la invención contempla el uso de un método mejorado para introducir células de *Agrobacterium* en una planta completa, particularmente una planta completa e intacta o una parte de una planta tal como un órgano de una planta o tejido vegetal como se describe en la solicitud copendiente núm. EP 10 16 9888.4, presentada el 16 de julio de 2010, cuya descripción se incorpora en la presente descripción en su totalidad. El método proporciona presión positiva en un fluido, o una combinación o presión positiva y negativa en un fluido, para facilitar que las células de *Agrobacterium* se infiltren en una planta completa, particularmente una planta completa e intacta o una parte de una planta tal como un órgano de una planta o tejido vegetal, a diferencia de métodos conocidos en la técnica que usan un vacío o presión negativa. La invención proporciona además sistemas y medios para usar en el método de acuerdo con la presente invención para suministrar presión positiva en un fluido a las plantas completas, particularmente plantas completas e intactas o partes de plantas tales como órganos de plantas o tejidos vegetales que están o se han puesto en contacto con células de *Agrobacterium*.

- 55 La presión positiva en un fluido se suministra cuando la planta completa, particularmente la planta completa e intacta o la parte de una planta, y las bacterias se someten a tratamiento con uno o más ciclos de presión en condiciones cerradas. La presión en un fluido es la presión en un punto dentro de un fluido, tal como agua o aire. Por ejemplo, en una condición cerrada, el volumen en el cual el fluido está contenido es constante. En diversas modalidades de la invención, la presión en un fluido es la presión de aire dentro de una cámara de un volumen fijo.

- 60 Por lo tanto, los valores de presión positiva útiles en la invención pueden expresarse en términos de un valor de porcentaje de la presión de aire ambiental, por ejemplo y sin limitación, 110 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 350 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 %, 700 %, 750 %, 800 %, 850 %, 900 %, 950 %, 1000 %, 1050 %, 1110 %, 1150 %, 1200 %, o cualquier valor intermedio, o cualquier valor mayor que los anteriores. Una convención similar puede usarse para describir la presión negativa que es un valor de presión menor que la presión de aire ambiental.

- 65

Una presión positiva puede expresarse alternativamente en términos de un valor absoluto, por ejemplo y sin limitación, 1,1 atm, 1,5 atm, 2 atm, 2,5 atm, 3 atm, 3,5 atm, 4 atm, 4,5 atm, 5 atm, 5,5 atm, 6 atm, 6,5 atm, 7 atm, 7,5 atm, 8 atm, 8,5 atm, 9 atm, 9,5 atm, 10 atm, 10,5 atm, 11 atm, 11,5 atm, 12 atm, etcétera; o 1,1 bar, 1,5 bar, 2 bar, 2,5 bar, 3 bar, 3,5 bar, 4 bar, 4,5 bar, 5 bar, 5,5 bar, 6 bar, 6,5 bar, 7 bar, 7,5 bar, 8 bar, 8,5 bar, 9 bar, 9,5 bar, 10 bar, 10,5 bar, 11 bar, 11,5 bar, 12 bar, o cualquier valor intermedio, o cualquier valor mayor que los anteriores. Cuando no se proporciona una presión de aire ambiental para la comparación en una descripción en el presente documento, la presión de aire ambiental es la presión atmosférica estándar en la Tierra al nivel del mar.

El término “ciclo de presión” usado en la presente descripción se refiere a una serie de cambios en la presión durante un período de tiempo. En una modalidad, un ciclo de presión comprende una presión objetivo, que es, la presión que debe alcanzarse dentro de un período de tiempo dado. Por ejemplo, durante un ciclo de presión, una presión deseada en una cámara empieza a partir de estar en equilibrio con la presión de aire ambiental, cambia a la presión objetivo, y regresa a la presión de aire ambiental. En consecuencia, una cámara usada en la invención puede empezar un ciclo de presión con el aumento de la presión por encima de la del aire atmosférico y termina un ciclo de presión al equilibrarse con el aire atmosférico.

En los métodos de la invención, puede aplicarse una pluralidad de diferentes ciclos de presión y cada uno puede aplicarse una o más veces, tal como pero no se limitan a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez veces. En consecuencia, en un método de la invención o aún en un ciclo de presión, la variación de presión en el tiempo puede expresarse mediante un gráfico o una forma de onda, tal como una onda sinusoidal, una onda cuadrada, una onda triangular, o una onda de dientes de sierra, o cualquier forma de onda que se aproxime a una de las anteriores.

Particularmente, un ciclo de presión puede comprender una presión objetivo que es una presión positiva. En determinadas modalidades, el método de la invención no comprende el uso de una presión objetivo que sea una presión negativa. En otras modalidades, se contempla el uso de una primera presión objetivo que es una presión positiva, así como una presión objetivo que es una presión negativa. En otras modalidades, una primera presión objetivo es una presión negativa, y la segunda presión objetivo es una presión positiva. Puede incluirse un período de reposo entre los ciclos de presión.

En determinadas modalidades, las células de *Agrobacterium* que comprenden la construcción de expresión se infiltran en una planta completa, particularmente una planta completa e intacta o una parte de una planta completa e intacta, tal como un órgano de una planta o tejido vegetal. En una modalidad, la infiltración se lleva a cabo en la presencia de un tensioactivo, que incluye tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, y zwitteriónicos. Los ejemplos no limitantes de un tensioactivo que puede usarse son Triton X-100 o Silwet L-77, un tensioactivo fuerte que muestra relativamente baja toxicidad en plantas.

En una modalidad, una planta completa e intacta se ubica de manera vertical hacia abajo dentro de una cámara y sus hojas se sumergen completamente en un líquido que comprende células de *Agrobacterium*. La cámara se conecta a una fuente de baja presión de aire a través de una válvula de entrada. Por ejemplo, para crear una presión atmosférica baja (aproximadamente 50 mbar).

Además del equipamiento anterior, los sistemas para usar en el método de acuerdo con la invención pueden comprender además, de manera opcional, medios para transportar una pluralidad de plantas completas o partes de plantas tales como órganos de plantas o tejidos vegetales desde una ubicación a la cámara, medios para facilitar el contacto de una pluralidad de plantas completas o tejidos vegetales con células de *Agrobacterium*, medios para recibir una pluralidad de plantas completas o tejidos vegetales en la cámara, medios para ubicar y reubicar la pluralidad de plantas completas o partes de plantas tales como órganos de plantas o tejidos vegetales en la cámara, medios para recuperar la pluralidad de plantas completas o partes de plantas de la cámara. Preferentemente, uno o más de los medios anteriores son sistemas electromecánicos automatizados e incluyen pero no se limitan a sistemas de transporte motorizado, sistemas de automatización industrial, sistemas de seguridad, sistemas de control de procesos, sistemas de comunicación de datos, sistemas de almacenamiento de datos y sistemas de computación.

En diversas modalidades, las células de *Agrobacterium* que albergan construcciones de expresión con un gen o genes, particularmente un gen o genes heterólogos, se usan para suministrar el o los genes a una planta completa e intacta o una parte de una planta tal como un órgano de una planta o tejido vegetal, para la expresión transitoria en las células y/o espacios extracelulares de la planta o partes de la planta. Generalmente, una construcción de expresión adecuada comprende: al menos una secuencia de un borde del T-ADN, una secuencia reguladora de la expresión (por ejemplo, un promotor que puede ser inducible o constitutivo, un promotor cuya actividad sea específica de un tejido o sesgada a un tejido), y un gen unido operativamente a la secuencia reguladora de la expresión. En determinadas modalidades, una construcción de expresión es parte de un vector que comprende uno o más orígenes de replicación, al menos un origen de replicación adecuado para la replicación del vector que comprende la construcción de expresión en especies de *Agrobacterium*.

El método de infiltración por presión positiva puede usarse para obtener la expresión transitoria de muchas especies de plantas, que incluyen pero no se limitan a: tabaco (especies de *Nicotiana*), lechuga, alfalfa, frijol mungo, espinaca, diente de león, radicchio, rúcula, endibia, escarola, achicoria, alcachofa, maíz, papa, arroz, soja, algodón, cereales de grano pequeño, trigo, cebada, sorgo, remolacha azucarera, colza, Crucifera (por ejemplo, Brassica, Arabidopsis) lenteja de agua, y tomate.

Un órgano o tejido vegetales adecuados generalmente pueden ser cualquier parte de la planta. En un aspecto preferido, el tejido vegetal es tejido foliar. En un aspecto, el tejido vegetal es tejido foliar de una planta que comprende hojas de al menos aproximadamente 7-8 cm en al menos una dimensión.

Prácticas de invernadero

Incubación en una posición invertida

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método general para incubar una planta después de la infiltración con una suspensión bacteriana que comprende una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos, dicho método comprende incubar la planta en una posición invertida. Preferentemente, la planta que se incuba en una posición invertida es una planta completa que se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos.

En otra modalidad, la planta que se incuba en una posición invertida es una planta transgénica.

En determinadas modalidades, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de incubación comprende incubar la planta infiltrada en una posición invertida. Se proporciona además un invernadero que se adapta para sustentar la incubación de plantas infiltradas en una posición invertida durante cualquier período de tiempo, particularmente durante un período de entre 5 días y 10 días, en donde las plantas infiltradas en posición invertida se iluminan desde arriba. En un aspecto de la invención, las plantas se iluminan durante 7 a 9 horas por 24 horas, particularmente durante 8 horas por 24 horas.

Este método conduce a una mayor expresión de proteína recombinante como se muestra en el Ejemplo 13.

En una modalidad de la invención, el método que comprende la incubación de una planta en una posición invertida puede usarse dentro del método de acuerdo con cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores, particularmente dentro de la etapa de incubación (iii) como se describe en el presente documento.

En una modalidad de la invención, la modificación de incubar una planta en una posición invertida, puede aplicarse al método de acuerdo con la invención teniendo en cuenta cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores, particularmente en el contexto de la etapa de incubación (iii) como se describe en el presente documento.

Iluminación

Aún en otro aspecto de la invención, se proporciona un método general para incubar una planta después de la infiltración con una suspensión bacteriana que comprende una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos, dicho método comprende incubar la planta en condiciones de luz diurna durante 5 horas a 15 horas por día (24 horas), 5 horas a 10 horas, 7 a 9 horas, preferentemente durante ocho horas por día (24 horas). El método es particularmente útil para mejorar el nivel de expresión transitoria de la proteína heteróloga como se ejemplifica en el Ejemplo 15.

En una modalidad, la planta infiltrada es una planta completa que se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos y se incuba en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día, preferentemente ocho horas por día. En determinadas modalidades, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha etapa de incubación comprende incubar la planta infiltrada en una posición invertida.

En una modalidad de la invención, la modificación de incubar la planta en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día, preferentemente ocho horas por día, puede aplicarse al método de acuerdo con la invención teniendo en cuenta cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores, particularmente en el contexto de la etapa de incubación (iii) como se describe en el presente documento.

Densidad de siembra

Aún en otro aspecto de la invención, se proporciona un método general que comprende cultivar una pluralidad de plantas a una densidad alta dentro de un área definida antes de infiltrar dichas plantas con una suspensión bacteriana que comprende una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente

una proteína o polipéptido heterólogos. Se contempla además que después de la infiltración, la planta infiltrada se incubaba a una densidad alta dentro de un área definida. Además se abarca un método en donde se siembra una pluralidad de plantas a una densidad alta tanto antes como después de la infiltración.

Particularmente, el método comprende cultivar una pluralidad de plantas a una densidad de al menos 25 a 500 plantas por metro cuadrado, al menos 50 a 400 plantas por metro cuadrado, al menos 100 a 300 plantas por metro cuadrado, al menos 150 a 250 plantas por metro cuadrado, al menos 100 a 900 plantas por metro cuadrado. En una modalidad, las plantas se cultivan a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado. En otra modalidad, las plantas se cultivan a una densidad de o al menos 500 plantas por metro cuadrado. La pluralidad de plantas, después de haberse cultivado en las condiciones anteriores durante un período de entre 30 días y 50 días después de la siembra, particularmente de entre 40 días y 50 días después de la siembra, pero particularmente durante 46 días después de la siembra, se infiltra con una suspensión de células de *Agrobacterium* que comprenden una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos a una DO₆₀₀ identificada en los párrafos precedentes.

En una modalidad, después de la infiltración, las plantas se incuban en una posición hacia arriba.

En otra, después de la infiltración, las plantas se incuban en una posición invertida. En particular, las plantas infiltradas se incuban en una posición invertida durante cualquier período de tiempo, particularmente durante un período de entre 5 días y 10 días, en donde las plantas infiltradas en posición invertida se iluminan desde arriba. En un aspecto de la invención, las plantas se iluminan durante 7 a 9 horas por 24 horas, particularmente durante 8 horas por 24 horas.

Este método conduce a una mayor expresión de proteína recombinante como se muestra en el Ejemplo 14.

El método es particularmente útil para reducir el costo de producción de la proteína heteróloga. Se proporciona además un invernadero que se adapta para cultivar plantas a una densidad de al menos 25 a 500 plantas por metro cuadrado, o al menos 100 plantas infiltradas por metro cuadrado.

En una modalidad, la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho método se modifica para comprender una etapa de cultivar una pluralidad de plantas de *Nicotiana tabacum* a una densidad alta dentro de un área definida antes de infiltrar dichas plantas con una suspensión bacteriana que comprende una secuencia de nucleótidos expresable de una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos. En particular, la pluralidad de plantas de *Nicotiana tabacum* se cultiva a una densidad de al menos 25 a 500 plantas por metro cuadrado, al menos 50 a 400 plantas por metro cuadrado, al menos 100 a 300 plantas por metro cuadrado, al menos 150 a 250 plantas por metro cuadrado, pero particularmente al menos 100 plantas por metro cuadrado.

En una modalidad de la invención, puede usarse un método para incubar una pluralidad de plantas infiltradas dentro de un área definida dentro del método de acuerdo con cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores, particularmente dentro de la etapa de incubación (iii) como se describe en el presente documento.

En una modalidad de la invención, la modificación de cultivar una pluralidad de plantas antes de la infiltración a una densidad alta con un área definida puede aplicarse al método de acuerdo con la invención teniendo en cuenta cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores.

Degradación enzimática de la pared celular de plantas infiltradas

Aún en otro aspecto de la invención, se proporciona un método general que comprende tratar una planta completa, intacta infiltrada con *Agrobacterium* con una o más enzimas que degradan o digieren la pared de la célula vegetal para ayudar a la extracción de la proteína heteróloga. En una modalidad, el método comprende infiltrar la planta infiltrada con *Agrobacterium* con una o más enzimas mediante técnicas conocidas en la materia, que incluyen pero no se limitan a infiltración con jeringa, infiltración al vacío e infiltración bajo presión positiva en un fluido. La técnica de infiltración permite antes de romper mecánicamente una planta infiltrada por *Agrobacterium*, suministrar enzimas digestivas en el espacio del apoplasto lo que da como resultado la degradación de la pared celular sin liberar la mayoría del contenido celular. Esta etapa de infiltración puede realizarse mediante el uso de un equipamiento similar que permita la infiltración de una planta completa e intacta con una suspensión celular de *Agrobacterium*. Este método puede usarse como una etapa opcional en los diversos métodos para producir una proteína heteróloga de interés según se describe en cualquiera de las modalidades precedentes. El Ejemplo 17 describe un experimento que demuestra la utilidad de este aspecto de la invención con plantas de tabaco infiltradas por *Agrobacterium* que producen hemaglutinina 5 de influenza (H5).

Pueden usarse muchas enzimas que se utilizan en procesos industriales para la ruptura de la pared celular de plantas, que incluyen pero no se limitan a celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y poligalacturonasas. Las celulasas que pueden usarse incluyen endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (denominadas además exoglucanasa, E.C. 3.2.1.91), o β -glucosidasas (denominadas además celobiasa, E.C. 3.2.1.21). Las

endoglucanasas hidrolizan enlaces β -glucósidos internamente y al azar a lo largo de las cadenas de celulosa mientras que las celobiohidrolasas eliminan moléculas de celobiosa de los extremos reductores y no reductores de las cadenas. Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa a dos moléculas de glucosa, y por lo tanto eliminan la inhibición de la celobiosa sobre las celobiohidrolasas y endoglucanasas. Las enzimas que tienen actividad poligalacturonasa hidrolizan los enlaces glicosídicos en una cadena de ácido poligalacturónico que se encuentra comúnmente en las paredes celulares de las plantas como cadenas de ácido α -D-galacturónico con enlace 1,4 y derivados metoxilados. Las xilanasas (EC3.2.1.8) escinden los enlaces β , 1-4 entre D-xilosa que forma el polímero xilano, un componente principal de la hemicelulosa de la planta. Muchas de estas enzimas se obtienen a partir de hongos (especies de *Trichoderma*, especies de *Rhizopus* y especies de *Aspergillus*). y microorganismos, y pueden adquirirse comercialmente como una mezcla, por ejemplo, MacerozymeTM (celulosa 0,1 U/mg, hemicelulasa, 0,25 U/mg, pectinasa 0,5 U/mg, bioWORLD, Dublin, Ohio, Estados Unidos); y DriselaseTM (laminarinasa, xilanasas y celulosa, Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Después de la infiltración con las enzimas, las plantas pueden incubarse durante un período de tiempo que se encuentra en el intervalo de al menos 1, 2, 5, 10, 12, 18, a 24 horas.

Rendimiento

En una modalidad, la invención se refiere a un método para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en *Nicotiana tabacum* de acuerdo con los aspectos o las modalidades anteriores con la condición de que cuando la secuencia de nucleótidos expresable codifique una proteína, tal como una proteína fluorescente verde Turbo (tGFP) o hemaglutinina H5, la acumulación de la proteína sea de al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 % del total de proteína soluble de la planta infiltrada; o que la acumulación del polipéptido o proteína sea a un nivel de al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 110 %, al menos 125 %, al menos 200 %, al menos 250 %, al menos 300 %, al menos 400 %, o al menos 500 % del que puede obtenerse en *N. benthamiana* cuando la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que comprende la misma secuencia de nucleótidos expresable se usa según se describe en la etapa ii) y la etapa iii), como se ejemplifica en los Ejemplos 14 y 15, respectivamente. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para medir y comparar el rendimiento del método y los controles.

Sistema para la producción a escala comercial de proteínas en plantas

En una modalidad, la invención se refiere a un sistema para producir una proteína o polipéptido, particularmente una proteína o polipéptido heterólogos en plantas de *Nicotiana tabacum*, dicho sistema comprende los siguientes elementos: (a) una planta completa de variedades, líneas de mejoramiento o cultivares seleccionados de *Nicotiana tabacum* de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, (b) una suspensión bacteriana de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que comprende células de una cepa de *Agrobacterium* que es compatible con las plantas seleccionadas de variedades, líneas de mejoramiento o cultivares de *Nicotiana tabacum* del elemento (a) de manera que dichas plantas muestren menos de 20 % de necrosis, menos de 10 % de necrosis, menos de 5 % de necrosis, menos de 2 % de necrosis, menos de 1 % de necrosis, 5 días después de que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante una jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO600 de 0,32, (c) un medio para infiltrar plantas completas con células de *Agrobacterium* de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, y (d) opcionalmente un invernadero para cultivar plantas a densidades altas e incubar la planta infiltrada que se adapta para sustentar (i) el cultivo de una pluralidad de plantas a una densidad de al menos 25 a 500 plantas por metro cuadrado, o al menos 100 plantas por metro cuadrado de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y como se ejemplifica en el Ejemplo 14; (ii) el cultivo de las plantas infiltradas en una posición invertida de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y como se ejemplifica en el Ejemplo 13 con iluminación desde arriba durante siete a nueve horas por día de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores y como se ejemplifica en el Ejemplo 15.

Composiciones farmacéuticas

Después de incubar la planta o tejido vegetal en condiciones adecuadas que permitan que la construcción de expresión exprese el péptido o proteína en una pluralidad de células vegetales, la proteína puede detectarse y cuantificarse en la planta o parte de una planta tal como el órgano de una planta o tejido vegetal o en las células de estos. Después de la cosecha, puede realizarse el aislamiento del péptido o la proteína mediante el uso de métodos de rutina en la técnica. Por ejemplo, al menos una porción de la biomasa puede homogeneizarse, y el péptido o la proteína recombinantes pueden extraerse y además purificarse. La extracción puede comprender empapar o sumergir el homogeneizado en un disolvente adecuado. Los métodos de purificación incluyen, pero no se limitan a, purificación por inmovilización y procedimientos de purificación basados en el tamaño específico de un péptido, proteína o complejo proteico, movilidad electroforética, actividad biológica, y/o carga neta del péptido o proteína que se va a aislar, o basado en la presencia de una molécula marcadora en la proteína. La caracterización del péptido o la proteína aislados puede realizarse por inmunoensayo o por otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos o proteínas pueden analizarse en geles de SDS-PAGE mediante transferencia Western, o mediante tinción con azul de Coomassie cuando el péptido o la proteína están sustancialmente purificados.

Las proteínas recombinantes producidas por los métodos de la invención pueden usarse como productos farmacéuticos, y pueden expresarse para utilizarlos como nutracéuticos y cosméticos, ya que estos productos se usan para la ingestión directa, inyección o aplicación (por ejemplo, administración tópica) a seres humanos. Puede expresarse además una proteína recombinante que sea útil en la producción de productos veterinarios regulados similarmente.

Los métodos de la invención pueden usarse además para expresar uno o más genes para reproducir vías enzimáticas para la síntesis química o para procesos industriales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un sólido, semisólido o relleno líquido, diluyente, material de encapsulación o formulación, no tóxicos y auxiliares de cualquier tipo. El término "parenteral" como se usa en la presente descripción se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular e infusión. El vehículo puede ser un vehículo parenteral, más particularmente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo también son útiles en esta invención, así como los liposomas. El vehículo contiene adecuadamente cantidades menores de aditivos tales como sustancias que aumentan la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos a los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; (poli)péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros, o PEG.

Breve descripción de las figuras, las tablas y las secuencias

La presente invención se describe además con referencia a las siguientes figuras, tablas y ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra diagramas esquemáticos de (A) el vector binario mínimo pC100 seleccionable en plantas y (B) el vector binario mínimo pPMP1.

La Figura 2 muestra los resultados de las pruebas de diversas variedades de *N. tabacum*, PM67, PM81, PM92, PM128, PM132, PM133 y PM204, para la expresión de la proteína fluorescente verde mediante el uso de diversos supresores del silenciamiento génico. Las plantas se infiltran con una suspensión bacteriana de A91 (cepa AGL1 que contiene la construcción genética de pC91 que contiene un casete de tGFP expresable en plantas) y AGL1 que contiene los supresores de silenciamiento génico p1 (A18), p25 (A19), AC1 (A20), 2b (A21), p19 del CNV (A32) y HcPro (A120). La expresión a los 6 días después de la infiltración se muestra en mg por kg de peso fresco congelado de hojas.

La Figura 3 muestra las variedades de tabaco Simmaba, PM132, Burley 21, PM16, PM21, K 149, PO1 y PO2 (A) y PM92, Yaka JB 125/3 y PM204 (B) infiltradas con diversas cepas de *Agrobacterium* que albergan un casete de expresión de tGFP en un vector binario pBINPLUS. Todas se prueban en combinación con AGL1(pC120) que contiene un supresor del silenciamiento génico HcPro. Las plantas se infiltran al vacío con las cepas de *Agrobacterium* AGL1 (A91), EHA105 (E91), GV2260 (G91), LBA4404 (L91), GV3101 (V91) y Cry-5 (Y91) y AGL1 (pC120). La concentración de TurboGFP se determina a los 6 días después de la infiltración y se muestra en mg por kg de peso congelado de hojas.

La Figura 4 muestra un análisis de transferencia Western de H5 en extractos crudos de *N. tabacum* PM132 y *N. benthamiana* que expresan transitoriamente H5. Una banda del tamaño esperado (75 kDa) se detecta en *N. tabacum* PM132 y *N. benthamiana* que expresan transitoriamente H5 y no en el control de simulación ni el control de tipo silvestre. Las proteínas solubles totales se extraen a partir del material congelado de hojas en polvo en PBS de Dulbecco 1x en una relación de 1 g de peso congelado en 2 ml de tampón de extracción. Iguaes volúmenes de extractos (correspondientes a 45 - 55 μ g de proteína total por pocillo) y la proteína control H5 se desnaturalizan en tampón de carga que contiene SDS + un agente reductor y se cargan en un gel de NuPAGE con Bis-Tris al 4-12 %. Las proteínas se transfieren a una membrana PVDF mediante el uso del aparato iBlot (Invitrogen). Detección de H5: 1) incubación con anticuerpo primario [anti-H5 de conejo, Immunotech núm. IT-003-005V, 1 mg/0,5 ml], a una dilución de 1/1000 O/N a 4° C; 2) incubación con anticuerpo secundario [anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP, Jackson Cat. núm. 11-035-046, 0,4 mg/ml] a una dilución de 1/10 000 durante 1 hora a temperatura ambiente; incubación con sustrato HRP ECL-Plus (GE núm. RPN2132) durante 5 min a temperatura ambiente, 4) detección de quimioluminiscencia con el Chemismart (Exposición 2 min, Apertura 8).

La Figura 5 muestra gráficos de contorno 2D de los efectos predichos de la densidad de *Agrobacterium* (OD del inóculo) y la relación de A91 con A120 (COI:SoS) en el inóculo sobre los niveles de expresión de TurboGFP a 6 DPI (en mg por kg de peso congelado; valores representados en cajas blancas) para tres variedades de tabaco: A Burley 21, B PM132 y C PM204.

La Figura 6 muestra los efectos de la eliminación de la etapa de centrifugación en la preparación del inóculo sobre la expresión transitoria en tabaco. Las plantas de las variedades de tabaco Burley 21, PM132 y PM204 se coinfiltran con A91 y A120 preparados a partir de cultivos que se centrifugan y se resuspenden en solución de infiltración o se diluyen directamente en la solución de infiltración. Las mediciones fluorométricas de la expresión de tGFP se llevan a cabo a los 6 DPI. Las barras indican el error estándar de la media.

La Figura 7 muestra la expresión de tGFP a los 4 y 6 días después de la infiltración en mg/kg de peso fresco de la biomasa de hojas en plantas de tabaco PM132 que se mantienen en posición vertical hacia arriba como normal o invertidas.

La Figura 8 muestra el curso de tiempo de la expresión en mg de tGFP/kg de la biomasa de hojas frescas en plantas de tabaco incubadas con poca luz durante 8 horas en comparación con un tiempo largo de 20 horas de luz, después de la infiltración.

La Tabla 1 enumera todas las variedades de *Nicotiana tabacum* probadas.

La Tabla 2 enumera veintiséis (26) variedades de *Nicotiana tabacum* con expresión del anticuerpo monoclonal C5-1 por encima de 25 % del control *N.benthamiana* según se determina mediante inmuno dot-blot. ++: señal entre 25 y 50 % del control *N.benthamiana* y +++: señal igual o por encima de 50 % del control *N.benthamiana*. Se proporciona el fenotipo de la planta infiltrada y se compara con la planta no infiltrada de la misma variedad.

La Tabla 3 enumera las características de las plantas de *N.tabacum* PM132 y PM217 cultivadas a 25 o 100 plantas por m cuadrado. La altura es en cm, la conductancia estomática en $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, el índice del contenido de clorofila (CCI) según se lee a partir del sensor de un medidor de clorofila CCM-200 (Opti-Science, Estados Unidos), el grosor de las hojas en mm y el contenido de agua en %.

La Tabla 4 muestra la expresión de tGFP y H5 en hojas de plantas de *N.tabacum* PM132 y PM217 cultivadas a 25 o 100 plantas por m cuadrado antes de la infiltración y después de la infiltración, incubadas durante 5 días en posición vertical hacia arriba o hacia abajo.

La Tabla 5 muestra las características de las plantas de *N.tabacum* PM132 cultivadas a 75 plantas por m cuadrado, usadas para determinar el efecto de la incubación en días cortos y largos después de la infiltración. La altura es en cm, la conductancia estomática en $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, el índice del contenido de clorofila (CCI) según se lee a partir del sensor de un medidor de clorofila CCM-200 (Opti-Science, Estados Unidos), el grosor de las hojas en mm y el contenido de agua en %.

En la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias que se representan en el listado de secuencias:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| Sec. con núm. de ident.: 1 | representa la secuencia de nucleótidos del vector pPMP1 |
| Sec. con núm. de ident.: 2 | representa la secuencia de nucleótidos del promotor mínimo de 35S-CaMV |
| Sec. con núm. de ident.: 3 | representa la secuencia de nucleótidos de 5' UTR HT-CPMV |
| Sec. con núm. de ident.: 4 | representa la secuencia de nucleótidos de 3' UTR HT-CPMV |
| Sec. con núm. de ident.: 5 | representa la secuencia de nucleótidos de P1-HcPro-P3 |
| Sec. con núm. de ident.: 6 | representa la secuencia de nucleótidos del iniciador directo PC201F |
| Sec. con núm. de ident.: 7 | representa la secuencia de nucleótidos del iniciador inverso PC202R |
| Sec. con núm. de ident.: 8 optimizada | representa la secuencia de nucleótidos de hemaglutinina 5 de influenza |
| Sec. con núm. de ident.: 9: | representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pMMV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3 |

Sec. con núm. de ident.: 10: representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pMMV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

5 Sec. con núm. de ident.: 11: representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pFMV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

Sec. con núm. de ident.: 12: representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pFMV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

10 Sec. con núm. de ident.: 13: representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pPCISV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

Sec. con núm. de ident.: 14: representa la secuencia de nucleótidos de un fragmento de promotor pPCISV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3

15 Sec. con núm. de ident.: 15: representa la secuencia de aminoácidos del péptido señal de la patatina

Sec. con núm. de ident.: 16: representa la secuencia no optimizada de la patatina de tabaco (ligeramente modificada) como en C148 (frente a la cadena pesada)

20 Sec. con núm. de ident.: 17: representa la secuencia optimizada de la patatina de tabaco como en C148 (frente a la cadena ligera)

25 Sec. con núm. de ident.: 18: representa la secuencia de nucleótidos de la secuencia de la cadena pesada madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148

Sec. con núm. de ident.: 19: representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada madura del rituximab

30 Sec. con núm. de ident.: 20: representa la secuencia de nucleótidos de la secuencia de la cadena ligera madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148

Sec. con núm. de ident.: 21: representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera madura del rituximab

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como una ilustración y no como una limitación. A menos que se indique de cualquier otra manera, la presente invención emplea técnicas y métodos convencionales de biología molecular, biología celular, tecnología de ADN recombinante, biología de plantas, fitomejoramiento y producción de proteínas.

Ejemplo 1: Agroinfiltración de plantas de tabaco

Este ejemplo describe diversos métodos para infiltrar variedades, líneas de mejoramiento, o cultivares seleccionados de *Nicotiana tabacum* con células de *Agrobacterium*. Una planta completa o un tejido vegetal pueden infiltrarse con *Agrobacterium* con ayuda de vacío, mediante alta presión o mediante una jeringa sin aguja. Antes de la infiltración, las plantas de tabaco se cultivan en el invernadero en bloques de lana de roca con un período de luz de 20 horas y un período de oscuridad de 4 horas, 26°C/20°C día/noche y 70 %/50 % de humedad relativa (día/noche). Las plantas se fertilizan mediante subirrigación.

Preparación del inóculo. Las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* que comprenden un vector binario que contiene el T-ADN con el gen de interés bajo el control de elementos reguladores en plantas se cultivan hasta una DO₆₀₀ >1,6 en medio YEB que comprende 2 g/l extracto de carne, 0,4 g/l extracto de levadura, 2 g/l Bacto-Peptona, 2 g/l de sacarosa, 0,1 g/l MgSO₄ y antibióticos adecuados para la selección de la cepa de *Agrobacterium* respectiva y el vector binario, en un matraz Erlenmeyer a 28 °C y 250 rpm en un agitador giratorio. El cultivo se diluye después 1:100 en medio fresco de caldo LB Miller que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 10 mM y antibióticos adecuados y se cultiva adicionalmente a 28 °C y 250 rpm en un agitador giratorio hasta una DO₆₀₀ >2. Las bacterias se recolectan mediante centrifugación durante 15 minutos a 8 000 g y 4 °C. Las bacterias sedimentadas se suspenden en solución de infiltración que contiene MgCl₂ 10 mM y MES 5 mM (denominado en la presente descripción como solución de infiltración) a un pH final de 5,6, y DO₆₀₀ >2. Opcionalmente, las bacterias pueden diluirse además en solución de infiltración y puede añadirse acetosiringona para inducir virulencia. Opcionalmente, una primera suspensión bacteriana de *Agrobacterium* preparada según se describió anteriormente, se mezcla con una segunda suspensión de *Agrobacterium* que alberga un segundo vector binario con un segundo gen expresable. Un ejemplo no limitante de dicho segundo gen es una secuencia codificante que codifica un supresor del silenciamiento génico. Opcionalmente, el inóculo puede almacenarse hasta una semana a 4-6 °C antes del uso.

Infiltración por jeringa. Una jeringa que tiene las dimensiones de una jeringa estándar de 2 ml se llena con la solución de infiltración bacteriana y, sin una aguja, se presiona contra el lado abaxial de una hoja. El pistón se presiona hacia abajo para forzar la entrada de la suspensión bacteriana en el tejido foliar. Esto se repite hasta que la mayoría de la superficie foliar se infiltra. Después de la infiltración, las plantas se mantienen en luz baja durante un tiempo mínimo de 8 horas y durante el primer día se protegen de la luz solar total. Al día siguiente, las plantas se colocan en condiciones normales de luz hasta la cosecha.

Infiltración al vacío. Las plantas se infiltran mediante inmersión de las partes aéreas en un vaso de precipitados de 10 L lleno con un inóculo bacteriano y la totalidad de la planta infectada o partes infectadas de la planta se exponen a una presión atmosférica muy reducida (generalmente denominada en la presente descripción como un vacío). La infiltración al vacío se realiza en una campana de vidrio (Schott-Duran Mobilex 300 mm) mediante el uso de una bomba Büchi V-710 conectada a un regulador V-855 y la presión se reduce a partir de la presión atmosférica (1 bar) hasta 50 mbar en 3 a 4 minutos. Una vez que se alcanza, el vacío en la campana se mantiene durante 1 minuto seguido por un regreso a la presión atmosférica en aproximadamente 2 segundos. La luz artificial (80-100 μmol fotón/ cm^2) se mantiene durante todo el proceso de infiltración para asegurar condiciones de luz consistentes. Después de la infiltración, las plantas se colocan junto con plantas control no infiltradas en el invernadero hasta la cosecha. Las condiciones de cultivo tales como la fertilización, fotoperiodo y temperatura son las mismas que se usaron antes de la infiltración. El agua y el fertilizante se administran a las plantas mediante el uso de un sistema de riego por goteo.

Cosecha y muestreo del material. El muestreo puede comenzar después de 16 horas, pero típicamente las hojas infiltradas o las áreas infiltradas de una hoja se cosechan después de 6 días de incubación en el invernadero. El material de las hojas se coloca en una bolsa termosellable, se sella y se coloca entre capas de hielo seco durante al menos 10 minutos. Después de cosechar, todas las muestras de hojas se almacenan a -80 °C hasta su procesamiento posterior. Las hojas cosechadas se homogenizan hasta obtener un polvo fino mediante el uso de un molinillo de café en hielo seco, se realiza un proceso de extracción mediante (i) dos etapas de agitación en vórtex durante 20 segundos cada una en tampón de extracción 3 vol/peso que contiene Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 0,2 % de Triton X-100, pH final 7,5, y (ii) mediante centrifugación a 20,000 g durante 15 minutos. Los extractos solubles se mantienen en hielo hasta su análisis.

Ejemplo 2: Vectores binarios para la expresión transitoria

Este ejemplo describe el diseño y desarrollo del vector pPMP1 y el vector binario de pC100 mínimo que contiene un gen de resistencia a la kanamicina para seleccionar las células vegetales transformadas y que se usa en esta solicitud.

Construcción de la región de T-ADN y un fragmento de cadena principal. La secuencia de nucleótidos del vector binario pBIN61 de múltiples copias (Bendahmane y otros, 2000. Plant Journal 21: 73-81) de aproximadamente 13,500 pares de bases de longitud se analiza para determinar los ácidos nucleicos que tienen una función en la replicación, el mantenimiento, la selección de células transgénicas y la transferencia de T-ADN. Se desarrolla una nueva secuencia de nucleótidos que solo comprende ácidos nucleicos que tienen una función según se describió anteriormente. La secuencia de nucleótidos resultante se sintetiza químicamente en dos partes. Un primer fragmento que contiene la región de T-ADN bordeada por una secuencia de un borde derecho de T-ADN (RB) y de un borde izquierdo de T-ADN (LB), el gen de resistencia a kanamicina (nptII) para la selección en plantas de pBIN61 bajo el control de un promotor de la nopalina sintasa (pNOS) y el terminador tNOS y sitios de restricción de *Stu*I, *Asc*I y *Eco*RI únicos, se sintetiza químicamente con sitios de restricción flanqueantes de *Pvu*II y se clona en el sitio de *Pvu*II del vector pMK derivado de pUC (Geneart, Regensburg, Alemania) que además contiene un origen de replicación ColE1 (Col E1 ori) y un gen bacteriano de resistencia a kanamicina (KmR), que resulta en pGA13. Un segundo fragmento que contiene la región de la cadena principal con un ColE1 ori y un origen de replicación oriV de RK2 mínimo y un gen que codifica para la proteína iniciadora de la replicación TrfA derivada de RK2 de pBIN61, se sintetiza químicamente con sitios de restricción de *Asc*I, *Stu*I y *Pvu*II únicos y se clona en el vector pMA derivado de pUC (Geneart, Regensburg, Alemania) que además contiene un gen de resistencia a ampicilina (ApR), que resulta en pGA14.

Diseño y desarrollo de pC100. El vector binario mínimo pC100 de selección en plantas (Figura 1A) se construye al combinar dos fragmentos, un primer fragmento y un segundo fragmento que se sintetizan *de novo*. El primer fragmento contiene 1, un gen de resistencia al fármaco kanamicina funcional en *E. coli* y *Agrobacterium* y que comprende el gen de neomicina fosfotransferasa III; 2, un origen de replicación ColE1; 3, un origen de replicación oriV mínimo (Kowalczyk L. y otros, Molecular Microbiology, 2005, 57(5): 1439-1449); 4, el gen *trfA1* de un plásmido IncP que activa el oriV (Kongsuwan K. y otros, J. Bacteriology, 2006, 188(15): 5501-5509), y 5, sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción *Asc*I y *Stu*I únicos en los extremos del fragmento para combinar dicho fragmento 1 y fragmento 2 para generar el vector binario mínimo pC100. El segundo fragmento contiene la región de T-ADN que contiene 6, una secuencia del borde izquierdo del T-ADN de un *Agrobacterium*; 7, una secuencia del borde derecho del T-ADN de un *Agrobacterium*; 8, opcionalmente, un gen marcador de selección para la selección de una célula vegetal transgénica y que comprende un gen de neomicina fosfotransferasa II bajo el

control de un promotor de nopalina sintasa y una secuencia terminadora de nopalina sintasa de un plásmido con nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*; 9, un sitio de reconocimiento único de la endonucleasa de restricción *EcoRI* para la clonación de un gen extraño y ubicado entre 7, el borde derecho de T-ADN y 8, el gen marcador de selección, y 10, sitios de reconocimiento únicos de endonucleasas de restricción *Ascl* y *Stul* en los extremos del fragmento para combinar dicho fragmento 2 y fragmento 1 para generar el vector binario mínimo pC100.

Construcción de un vector binario mínimo pPMP1. pPMP1 (5139 pb; Figura 1B) se construye mediante la eliminación del gen *nptII* de selección en plantas de pC100 lo que genera el vector binario mínimo pPMP1 con la sec. con núm. de ident.: 1. pPMP1 contiene un sitio de restricción único de *EcoRI* en la posición +1; un LB en la posición +69 a +94; una primera secuencia hueco de 250 pb en donde la secuencia hueco no tiene una función en la replicación de pPMP1, el mantenimiento en una célula bacteriana, o la transferencia de la región de T-ADN a una célula vegetal; una primera secuencia de aproximadamente 1100 pb que contiene una secuencia codificante del gen *KmR* de +653 a +1454 y aproximadamente 300 pb de secuencias reguladoras corriente arriba y corriente abajo de la secuencia codificante; una segunda secuencia hueco de aproximadamente 150 pb; una segunda secuencia que contiene un *ColE1* ori de +1602 a +2269; una tercera secuencia hueco de aproximadamente 150 pb; una tercera secuencia de aproximadamente 1500 pb que contiene una secuencia codificante de *aTrfA* de +3662 a +2517 y aproximadamente 350 pb de secuencias reguladoras corriente arriba y corriente abajo de la secuencia codificante; una cuarta secuencia hueco de aproximadamente 450 pb; una cuarta secuencia que contiene un *RK2* oriV de +4932 a 4303; una quinta secuencia hueco de 109 pb; un RB en la posición 5041 a 5066 y un sitio de restricción único de *EcoRI* en la posición +5139.

Ejemplo 3: Ensayos reporteros para visualizar la expresión transitoria en tabaco

Este ejemplo describe diversos ensayos reporteros para usar en células vegetales para determinar la eficacia de la transformación y la expresión de un gen heterólogo en dichas células vegetales.

Ensayo de beta-glucuronidasa. La beta-glucuronidasa se usa como un reportero y se prueba de acuerdo con el método descrito en Jefferson y otros, EMBO J, 1987, 6:3901-3907.

Ensayo de la proteína fluorescente verde. Las plantas de tabaco se coinfiltran con células de la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene (i) el supresor del silenciamiento génico p19, y separadamente (ii) una variante mejorada de la proteína fluorescente verde del copépodo *Pontellina plumata*, disponible comercialmente como TurboGFP (Evrogen, Estados Unidos, catálogo núm. FP552). La expresión de p19 está dirigida por un promotor doble de 35S del virus del mosaico de la coliflor. La expresión de TurboGFP está dirigida por un promotor mínimo de 35S del virus del mosaico de la coliflor y una 5' UTR del virus del mosaico del caupí (HT-CPMV). Las concentraciones bacterianas en la mezcla de infiltración se ajustan a $DO_{600}=0,16$ para cada una de las dos suspensiones bacterianas, una que comprende la secuencia codificante de TurboGFP y la otra el supresor del silenciamiento génico p19. Las plantas para la infiltración se cultivan en el invernadero en bloques de lana de roca con un período de luz de 20 horas y un período de oscuridad de 4 horas, 26°C/20°C temperatura de día/noche y 70 %/50 % de humedad relativa (día/noche). Las plantas se fertilizan mediante subirrigación. Las plantas se infiltran a 50 mbar durante 1 minuto de acuerdo con protocolos de infiltración estándar o mediante infiltración con jeringa según se describió en el Ejemplo 1.

Inmediatamente después de la infiltración al vacío las plantas se cuelgan en posición vertical hacia abajo durante un par de minutos en una rejilla para reducir el exceso de la solución de infiltración que permanece en las hojas y después se colocan sobre bancos del invernadero para la otra parte del experimento. Las formulaciones fertilizantes después de la infiltración se mantienen las mismas que antes de la infiltración y la fertirrigación se suministra a través de un sistema de riego por goteo dos veces al día durante 45 segundos. La expresión de GFP en plantas se analiza cualitativa y cuantitativamente. Las estimaciones cualitativas de GFP se realizan bajo luz azul (HL32T Hand Lamp, Clare Chemical Research, Estados Unidos) que emite luz dentro del intervalo de excitación de la TurboGFP (longitud de onda de excitación = 482 nm y longitud de onda de emisión = 502 nm). El análisis cuantitativo de GFP en las hojas se determina por mediciones de la fluorescencia en un lector de microplacas Modulus (Turner Biosystems) en el modo de fluorescencia con un kit para óptica azul (longitud de onda de excitación = 490 nm y longitud de onda de emisión = 510-570 nm). En cualquier punto determinado de la cosecha, se recolectan discos de hojas de aproximadamente 80 mg con un perforador de disco de hojas a partir de cinco hojas por planta (hojas completamente expandidas de las posiciones 1-5, donde 0 representa el meristemo apical de los brotes y 1, la primera hoja) de tres plantas por tratamiento. Las muestras se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C y después se muelen en un TissueLyser (Qiagen) durante aproximadamente 2,5 minutos en la presencia de 1 ml de tampón de extracción que comprende Tris 50 mM, DTT 2 mM, NaCl 150 mM, 1 % Triton X-100 y Urea 4 M, pH 7,4. Después de molidas, las muestras se centrifugan a velocidad máxima durante 10 min en una microcentrífuga y se recogen 500 µl del sobrenadante y se almacenan a -20 °C hasta su análisis. Las muestras de las cinco hojas de una única planta se mezclan al recolectar 200 µl del sobrenadante de cada extracto en un solo tubo de microcentrífuga. Los extractos mezclados se centrifugan de nuevo durante 10 min a 4 °C y se transfieren 700 µl del sobrenadante a un tubo fresco. Para la cuantificación de la fluorescencia, se diluyen 5 µl del sobrenadante en 195 µl del tampón de extracción y se mide en un lector de microplacas. La concentración de GFP se calcula mediante el uso de una curva estándar obtenida con proteína TurboGFP recombinante comercial. La curva estándar

se prepara mediante la adición de diferentes cantidades de proteína TurboGFP recombinante a un extracto de una planta de tabaco control y se diluye 1:40 en tampón de extracción.

Ejemplo 4: Comparación de variedades de *Nicotiana tabacum* para la expresión transitoria

Este ejemplo describe las comparaciones de (i) la expresión de un anticuerpo monoclonal C5-1 en más de 90 variedades de *Nicotiana tabacum* después de la agroinfiltración y (ii) las características fenotípicas de las plantas antes y después de la infiltración.

Variedades de Nicotiana tabacum. Más de noventa (>90) variedades de *Nicotiana tabacum* como se menciona en la Tabla 1 se prueban con el objetivo de identificar líneas de tabaco adecuadas para la expresión transitoria de una proteína recombinante. Las líneas de tabaco se escogen de manera que incluyan la mayor diversidad posible de tipos de tabaco cultivados en todo el mundo, que incluyen tabaco curado al humo, Burley, líneas de tabaco oriental, semi oriental y envolturas de cigarro. Se probaron las siguientes variedades de tabaco: N.tabacum AA 37-1, N.tabacum B 13P, N.tabacum Xanthi (Mitchell-Mor), N.tabacum KTRD#3 Híbrido 107, N.tabacum Bel-W3, N.tabacum 79-615, N.tabacum Samsun Holmes NN, F4 del cruce N.tabacum BU21 x N.tabacum Hoja Parado, línea 97, N.tabacum KTRDC#2 Híbrido 49, N.tabacum KTRDC#4 Híbrido 110, N.tabacum Burley 21, N.tabacum PM016, N.tabacum KTRDC#5 KY 160 SI, N.tabacum KTRDC#7 FCA, N.tabacum KTRDC#6 TN 86 SI, N.tabacum PM021, N.tabacum K 149, N.tabacum K 326, N.tabacum K 346, N.tabacum K 358, N.tabacum K 394, N.tabacum K 399, N.tabacum K 730, N.tabacum KY 10, N.tabacum KY 14, N.tabacum KY 160, N.tabacum KY 17, N.tabacum KY 8959, N.tabacum KY 9, N.tabacum KY 907, N.tabacum MD 609, N.tabacum McNair 373, N.tabacum NC 2000, N.tabacum PG 01, N.tabacum PG 04, N.tabacum PO1, N.tabacum PO2, N.tabacum PO3, N.tabacum RG 11, N.tabacum RG 17, N.tabacum RG 8, N.tabacum Speight G-28, N.tabacum TN 86, N.tabacum TN 90, N.tabacum VA 509, N.tabacum AS44, N.tabacum Banket A1, N.tabacum Basma Drama B84/31, N.tabacum Basma I Zichna ZP4/B, N.tabacum Basma Xanthi BX 2A, N.tabacum Batek, N.tabacum Besuki Jember, N.tabacum C104, N.tabacum Coker 319, N.tabacum Coker 347, N.tabacum Criollo Misionero, N.tabacum PM092, N.tabacum Delcrest, N.tabacum Djebel 81, N.tabacum DVH 405, N.tabacum Galpão Comum, N.tabacum HB04P, N.tabacum Hicks Broadleaf, N.tabacum Kabakulak Ellassona, N.tabacum PM102, N.tabacum Kutsage E1, N.tabacum KY 14xL8, N.tabacum KY 171, N.tabacum LA BU 21, N.tabacum McNair 944, N.tabacum NC 2326, N.tabacum NC 71, N.tabacum NC 297, N.tabacum NC 3, N.tabacum PVH 03, N.tabacum PVH 09, N.tabacum PVH 19, N.tabacum PVH 2110, N.tabacum Red Russian, N.tabacum Samsun, N.tabacum Saplak, N.tabacum Simmaba, N.tabacum Talgar 28, N.tabacum PM132, N.tabacum Wislica, N.tabacum Yayaldag, N.tabacum NC 4, N.tabacum TR Madole, N.tabacum Prilep HC-72, N.tabacum Prilep P23, N.tabacum Prilep PB 156/1, N.tabacum Prilep P12-2/1, N.tabacum Yaka JK-48, N.tabacum Yaka JB 125/3, N.tabacum TI-1068, N.tabacum KDH-960, N.tabacum TI-1070, N.tabacum TW136, N.tabacum PM204, N.tabacum PM205, N.tabacum Basma, N.tabacum TKF 4028, N.tabacum L8, N.tabacum TKF 2002, N.tabacum TN90, N.tabacum GR141, N.tabacum Basma xanthi, N.tabacum GR149, N.tabacum PM216, N.tabacum PM217, N.tabacum GR153, N.tabacum Petit Havana, N.tabacum PM215.

Las variedades de tabaco pueden obtenerse a partir de la colección de *Nicotiana* de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Departamento de Ciencias de Cultivos (Oxford, Carolina del Norte, Estados Unidos). Para todas las líneas, se miden parámetros agronómicos (biomasa, fertilidad, homogeneidad) y analíticos (total de proteína soluble, proteasas totales, alcaloides totales). Con este propósito, las plantas de tabaco se cultivan individualmente en macetas de 12 cm bajo un sistema convencional de bandejas flotantes en un invernadero. Los parámetros agronómicos y analíticos se miden en el momento de la cosecha. Los estudios de expresión transitoria se realizan mediante coinfiltración con jeringa de una primera y una segunda suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. La primera suspensión de *A. tumefaciens* es una bacteria AGL1 de *A. tumefaciens* que alberga un vector binario que comprende la secuencia codificante de un anticuerpo monoclonal bajo el control de elementos reguladores en plantas. La segunda suspensión de *A. tumefaciens* es una bacteria AGL1 que alberga la secuencia codificante del supresor del silenciamiento génico p19 del virus de la necrosis del pepino bajo el control de elementos reguladores en plantas. Todos los experimentos de infiltración se realizan por triplicado en tres plantas cada uno. Una planta adicional se mantiene como control para cada línea de tabaco.

Construcciones genéticas. La construcción genética C7 es un vector binario derivado de pCambia que contiene dos casetes de expresión que comprenden la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal C5-1 bajo el control de la secuencia promotora y terminadora de pPC de la plastocianina. La construcción genética C32 es un vector binario derivado de pKYLX7 que contiene un casete de expresión que comprende el supresor del silenciamiento génico p19 del virus de la necrosis del pepino (CNV) bajo el control del promotor y el terminador de 35S del virus del mosaico de la coliflor. Todos los vectores binarios están en la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Expresión transitoria del anticuerpo monoclonal C5-1. Las plantas de tabaco se cultivan individualmente en una maceta de 12 cm en el invernadero. Tres plantas de cada variedad de tabaco se infiltran con una suspensión bacteriana mediante el uso de una jeringa según se describió en el Ejemplo 1. A los 6 días después de la infiltración, todas las hojas infiltradas de una planta se recolectan en una bolsa termosellable, se congelan a -80 °C y después se muelen hasta obtener un polvo fino y totalmente homogeneizado. De cada planta, se extraen las proteínas solubles totales a partir de aproximadamente 1 g de peso congelado de polvo de hoja molido en 3 ml de tampón de extracción. El tampón de extracción es Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 0,1 % de Triton X-100, Urea 4 M y DTT 2

mM. Como referencia, se prepara un extracto idéntico de plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas al mismo tiempo con las mismas suspensiones de *Agrobacterium*. Para el análisis de la expresión de C5-1, los extractos vegetales se diluyen 200 veces y las diluciones en serie se adicionan a una membrana de nitrocelulosa mediante el uso del sistema de inmunoensayo dot-blot Easy-titer ELIFA (Pierce). Las membranas de nitrocelulosa se incuban con un anticuerpo marcado con HRP de Jackson ImmunoResearch (cat. núm. 115-0.5-205) a una dilución de 1:5,000. Las señales en las membranas se analizan visualmente y se da una puntuación a cada planta en base a la interpretación visual de la intensidad de la señal en comparación con la de diluciones en serie del extracto de *N. benthamiana* de referencia. La puntuación es la siguiente:

10 + = punto detectable pero por debajo del 25 % de la señal de la muestra de referencia,

++ = entre 25 y 50 % de la señal de la muestra de referencia,

+++ = entre 50 y 100 % de la señal de la muestra de referencia.

15 *Resultados.* No se detecta señal en las plantas control y de las 90 variedades analizadas, 26 variedades muestran una expresión razonable y tienen una puntuación ++. 64 variedades no muestran ninguna o solo tienen poca expresión. Una lista de las 26 variedades que muestran expresión del anticuerpo monoclonal C5-1 se presenta en la Tabla 2.

20 Ejemplo 5: Efecto de supresores del silenciamiento génico sobre la expresión transitoria de la proteína fluorescente verde en *N. tabacum*.

25 En este ejemplo se describe una comparación del efecto de diversos supresores del silenciamiento génico sobre la expresión de una construcción genética reportera en un número de variedades de tabaco mediante el uso de agroinfiltración. Se describe además el efecto de (i) el promotor que dirige la expresión del supresor de silenciamiento génico y (ii) la relación de la proteína objetivo con respecto al supresor de silenciamiento génico.

30 *Reportero y supresor de las construcciones de silenciamiento génico.* El gen de la proteína fluorescente verde es el gen de TurboGFP (tGFP) de Evrogen (ver el Ejemplo 3). El gen de TurboGFP se clona bajo el control del promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia de HT-CPMV y la secuencia terminadora de NOS en pBINPLUS, lo que resulta en la construcción genética pC91. Se prueban los siguientes supresores del silenciamiento génico: la proteína p19 del virus de la necrosis del pepino (CNV), la proteína p1 del virus del moteado amarillo del arroz (RYMV), la proteína p25 del virus X de la papa (PVX), la proteína AC2 del virus del mosaico africano de la yuca (ACMV), la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) y la proteinasa del componente asistente (HcPro) del virus del grabado del tabaco (TEV). Los supresores del silenciamiento génico p1 de RYMV, p25 de PVX, AC2 de ACMV, 2b de CMV, HcPro de PVY y p19 de CNV se clonan por los extremos romos en el sitio de SmaI de pBIN61 (Bendahmane y otros, Plant J, 2000, 21:73-81) en la orientación codificante bajo el control de la secuencia promotora y terminadora de 35S del virus del mosaico de la coliflor para generar las construcciones genéticas pC18, pC19, pC20, pC21, pC120 y pC32, respectivamente. Todas las secuencias están disponibles públicamente

45 *Construcciones genéticas de promotores.* Para probar el efecto de diversos promotores que dirigen la expresión de un supresor del silenciamiento génico, p19 de CNV como se presenta en la construcción genética pC32 bajo el control del promotor y el terminador de 35S del virus del mosaico de la coliflor, también se coloca bajo (i) el control del promotor de la nopalina sintasa pNOS (construcción genética pC224) y (ii) el promotor pPC de la plastocianina del cultivar WL357HQ de *Medicago sativa* (GenBank EF628506.1) lo que resulta en una construcción genética pC226 relacionada con pBIN61.

50 *Material vegetal.* Las plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* PM67, PM81, PM92, PM128, PM132, PM133 y PM204 se cultivan en el invernadero según se describió en el Ejemplo 4.

55 *Infiltración y análisis de la expresión.* Las plantas de seis y siete semanas de edad se infiltran mediante infiltración al vacío según se describió en el Ejemplo 1. Todas las construcciones genéticas son en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. A18 es AGL1(pC18), A19 es AGL1(pC19), A20 es AGL1(pC20), A21 es AGL1(pC21), A32 es AGL1(pC32), A120 es AGL1(pC120), A224 es AGL1(pC224), A226 es AGL1(pC226) y A91 es AGL1(pC91). El análisis de la expresión de la proteína fluorescente verde es según se describió en el Ejemplo 3.

60 *Resultados de las pruebas de diversas variedades de N. tabacum y supresores del silenciamiento génico.* La eficacia de los diversos supresores del silenciamiento génico para aumentar la expresión de tGFP en tabaco se compara con la de las plantas de *N. benthamiana*. Dos variedades, PM92 y Wisliça de *N. tabacum* mostraron una necrosis y clorosis más pronunciada. Ninguno de los supresores del silenciamiento génico provocaron síntomas de estrés visibles en *N. benthamiana*. La expresión de tGFP en *N. benthamiana* se verifica bajo luz azul a 6 DPI y los mejores resultados se obtienen con plantas cotransfectadas con la construcción genética pC120 que produjo una señal de fluorescencia de GFP muy fuerte. La fluorescencia de tGFP en hojas de *N. tabacum* es máxima cuando las plantas de tabaco de las siete variedades analizadas se cotransfectan con el supresor del silenciamiento génico

HcPro como en pC120 (Figura 2). Una expresión razonable también se encuentra cuando PM204 de *N. tabacum* se coinfiltra con el supresor del silenciamiento génico p1 del RYMV (pC18 en A18; Figura 2) y el supresor del silenciamiento génico AC2 del ACMV (pC20 en A20; Figura 2). Los mejores resultados se obtienen para PM204 de *N. tabacum* para tres de los supresores de silenciamiento génico probados y la mayor expresión se encuentra cuando se coinfiltra con HcPro (pC120), seguido por AC2 (pC20) y p1 (pC18).

Resultados de las pruebas de PM132 y 204 de N. tabacum y los supresores de silenciamiento génico. Los efectos de los supresores del silenciamiento génico HcPro de TEV, AC2 de ACMV y p19 de CNV sobre la expresión de tGFP en PM132 y PM204 se prueban en plantas de 6 semanas de edad. Además, se prueban los efectos de tres promotores diferentes expresables en plantas que dirigen al supresor de silenciamiento génico p19 de CNV. Se prueban los siguientes promotores: el promotor y terminador de 35S del virus del mosaico de la coliflor en pC32, el promotor y terminador de nopalina sintasa en pC224 y el promotor y terminador de pPC plastocianina en pC226. La cuantificación de los niveles de expresión de tGFP a los 6 días después de la infiltración mostró que se obtiene una alta expresión solo cuando el supresor del silenciamiento HcPro se usa en combinación con A91 que alberga la construcción genética de tGFP. Los niveles de expresión en PM132 y PM204 son mayores en más de 3 veces que los obtenidos para los otros supresores del silenciamiento génico. Sorprendentemente, se observa hasta un aumento de 10 veces en los niveles de expresión de tGFP en PM132 y PM204 cuando se infiltran plantas de tabaco de 6 semanas de edad en comparación con plantas de 7 semanas de edad.

Ejemplo 6: Comparación de la productividad de biomasa, alcaloide, proteína soluble total y actividad de proteinasa total de variedades de tabaco

Este ejemplo proporciona una comparación de la productividad de biomasa, contenidos totales de proteínas solubles, contenido de proteinasa y contenido de alcaloide de un número de variedades de *N. tabacum*.

Material vegetal. Todas las variedades de tabaco mencionadas en la Tabla 1 y descritas en el Ejemplo 5 se cultivan en bandejas de espuma de poliestireno de 288 cavidades (0,25 m²/bandeja) mediante el uso de un sistema convencional de bandejas flotantes. Las variedades de tabaco se cultivan en dos réplicas mediante el uso de un diseño en bloque aleatorizado en el invernadero. Las hojas se cosechan en diversas etapas para determinar el contenido total de proteína soluble, el contenido de alcaloide y proteasa total de las hojas. Las hojas de las plantas de tabaco cultivadas en invernadero se recolectan en el invernadero, se congelan rápidamente en nitrógeno líquido y se muelen hasta obtener un polvo fino que se transfiere a tubos de 50 ml y se almacena a -80 °C hasta la realización de los ensayos.

Extracción del material de las hojas para el ensayo enzimático. El polvo de las hojas de tabaco molidas se mezcla con cuatro volúmenes de tampón de extracción que contiene fosfato de potasio 50 mM, tamponado con NaOH a pH 7,5, 1 % de PVP insoluble y 0,1 % de β-mercaptoetanol. Los homogeneizados se centrifugan durante 10 minutos a 1,200 g y el sobrenadante se usa para determinar la actividad enzimática de proteasas y para la determinación del contenido total de proteínas solubles.

Ensayo enzimático. La actividad de digestión del Azocoll (azocollase) se determina mediante la medición de la liberación del colorante rojo del Azocoll (Calbiochem) según se describe por Ragster y Chrispeels, Plant Physiology, 1979, 64: 857-862. Veinte mg del sustrato Azocoll se mezclan con 50-100 µl del extracto enzimático en Tris-HCl 25 mM, tampón a pH 9,0 en un volumen total de 2 ml y se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos. La reacción termina al enfriar los tubos a 2 °C durante 15 min y después centrifugarlos a 2,000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se coloca en el espectrofotómetro y se mide la extinción a 520 nm.

Determinación de alcaloides. Se transfieren 0,1 g del polvo de hojas de tabaco molidas en un frasco de vidrio y se añaden 0,5 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH 2N). Después de 15 minutos, se añaden 5 ml de una solución de metil-tercbutil éter que contiene quinolina a 0,4 mg/ml y la muestra se agita durante 2,5 horas. La capa superior del fluido se transfiere a un frasco de centelleo de vidrio limpio y se carga en un muestreador automático del cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL para la medición. La cantidad de alcaloide se mide según se describe por Chen y otros, Beitrage zur Tabakforschung International, 2005, 21: 369-379.

Total de proteína soluble. El contenido total de proteína soluble (TSP) en los extractos de hojas se determina mediante el uso del reactivo del ensayo Coomassie-Plus (Pierce) mediante mediciones de absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm según se describe en Bradford, Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254. Los extractos se diluyen 1:10 en agua ultrapura y se cargan 10 µl por triplicado en una microplaca de fondo plano.

Resultados. La actividad de proteasas del extracto de Coker 347, PM132, PM092, PM204, PM102 y Saplak fue de 145,6, 118,4, 116,6, 109,8, 39,7 y 15,1, respectivamente. La productividad de biomasa en hojas en g/m cuadrado de F4 (BU21 x Hoja Parado)/97, PM102, PM132, PM204, PM092 fue de 400938, 318306, 190506, 187442 y 187422, respectivamente. El contenido de alcaloides de PM016, PM021, PM092, PM102, PM132 y PM204 en mg/g de tejido foliar es de 3,57, 1,79, 0,41, 3,2, 0,79 y 0,66 respectivamente. El contenido de proteínas de los extractos de PM016, PM021, PM092, PM102, PM132 y PM204 en µg/ml del extracto es de 525, 374, 317, 288, 261 y 311 respectivamente.

Ejemplo 7: Efecto de las cepas de *Agrobacterium* sobre la expresión transitoria

En este ejemplo, se describe el efecto de usar seis cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens* para la agroinfiltración de variedades de tabaco, sobre la expresión de una proteína objetivo.

Cepas de *Agrobacterium* y vectores binarios. Para probar el efecto de las cepas de *Agrobacterium* sobre la expresión transitoria, se infiltran plantas de tabaco al vacío según se describe en el Ejemplo 1 con las cepas de *A. tumefaciens* AGL1, EHA105, GV2260, GV3101, Cry5 y LBA4404 cada una de las cuales alberga la construcción genética pC91. pC91 contiene un gen de tGFP bajo el control del promotor de 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia líder de HT-CPMV y una secuencia terminadora de la nopalina sintasa en un vector binario pBINPLUS. Todas se coinfiltran con AGL1 que alberga pC120 que comprende la secuencia expresable de HcPro. A91 es AGL1(pC91), E91 es EHA105(pC91), G91 es GV2260(pC91), L91 es LBA4404(pC91), V91 es GV3101(pC91), Y91 es Chry5(pC91) y A120 es AGL1(pC120).

Preparación del inóculo. Los cultivos de *Agrobacterium* se realizan en MES LB Miller a pH 5,6, suplementado con antibióticos adecuados, hasta una densidad óptica final (DO_{600}) de $> 2,0$. Las bacterias se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en solución de infiltración ($MgCl_2$ 10 mM, MES 5 mM, pH 5,6). En cada experimento, una suspensión de *Agrobacterium* que alberga una construcción pC91 se mezcla en volúmenes iguales con una suspensión de *Agrobacterium* que porta el gen para un supresor del silenciamiento para generar un inóculo concentrado 6x. En el día de la infiltración, el inóculo concentrado se diluye a una concentración final 1x (correspondiente a una DO_{600} de aproximadamente 0,3) en la solución de infiltración y se equilibra a temperatura ambiente.

Material vegetal. Las plantas de *N. tabacum* Burley 21, PM16, PM21, K149, PO1, PO2, PM92, Simmaba, PM132, Wisliça, Yaka JB 125/3 y PM204 se cultivan en el invernadero en macetas de 12 cm con un régimen de fotoperiodo de 20 horas de luz y 4 horas de oscuridad, a una temperatura de 26 °C/20 °C día/noche y una humedad relativa de 70 %/50 % día/noche.

Infiltración de las plantas. Las plantas se infiltran al vacío como se describió en el Ejemplo 1. La luz artificial (80-100 $\mu\text{mol fotón}/\text{cm}^2$) se mantiene durante todo el proceso de infiltración para asegurar condiciones de luz consistentes. Después de la infiltración, las plantas se colocan de nuevo en el invernadero hasta la cosecha. La aparición de síntomas de estrés tales como clorosis (amarillamiento de las hojas) y lesiones necróticas (puntos "muertos") se controlan visualmente mediante la comparación de las plantas infiltradas con los controles no infiltrados. Las condiciones de cultivo tales como la fertilización, el fotoperiodo y la temperatura son las mismas que las utilizadas antes de la infiltración, pero ahora se administran agua y fertilizantes a las plantas mediante el uso de un sistema de riego por goteo. De cuatro a seis días después de la infiltración, las plantas se colocan bajo luz azul y todas las hojas infiltradas que muestran fluorescencia se recogen, se colocan en una bolsa con cierre y se almacenan a -80 ° C hasta su procesamiento para el análisis.

Imágenes y cuantificación de de Turbo GFP. La acumulación de tGFP en las hojas cosechadas se controla bajo luz azul en una cámara oscura. Las hojas cosechadas se homogenizan hasta obtener un polvo fino en hielo seco y las muestras de 1,00 g $\pm$ 0,05 g de peso de polvo congelado se extraen en 3 ml de tampón de extracción (Tris base 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; 0,2 % de Triton X-100; pH 7,5) mediante dos etapas de agitación en vórtex durante 20 segundos, seguido de centrifugación a 20'000 g durante 15 min. Los extractos solubles se mantienen en hielo para su análisis. Los extractos de *N. tabacum* se diluyen 1:50 en tampón de extracción y se cargan 200 μl por triplicado en una placa negra de 96 pocillos (Corning). La concentración de TurboGFP en los extractos se determina mediante mediciones de fluorescencia en un lector de microplacas Modulus (Turner Biosystems) con un kit para óptica azul (longitud de onda de excitación: 490 nm / longitud de onda de emisión: 510-570 nm). La fluorescencia de las muestras se corrige al sustraer la auto-fluorescencia de los extractos de las plantas control no infiltradas. Una curva estándar se prepara mediante la adición de proteína control TurboGFP (rTurbo GFP, Evrogen núm. FP552) en un intervalo de concentración de 4000 a 125 ng/ml a un extracto no infiltrado diluido 1:50 final en tampón de extracción.

Resultados. Las plantas se infiltran en dos lotes. En primer lugar, *N. tabacum* Burley 21, PM016, PM21, K149, PO1, PO2, Simmaba y PM132 se infiltran y se analizan para determinar la expresión de tGFP. Seis días después de la infiltración puede observarse que las cepas de *Agrobacterium* Cry5 y GV2260 provocaron severas respuestas de estrés que incluyen clorosis y lesiones necróticas en las hojas de la mayoría de las variedades de tabaco probadas. Además, las variedades de tabaco PM016, PM21 y K149 parecieron ser muy sensibles a la agroinfiltración y se observa una fuerte necrosis en muchas de las cepas probadas. La mayor expresión para todas las cepas probadas es consistente con PM132 (Figura 3A). Sorprendentemente, se obtiene una expresión más de dos veces mayor para las cepas de *Agrobacterium* AGL1 y EHA105 que albergan la construcción genética pC91, las cuales alcanzan aproximadamente 700 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas en comparación con 400 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas para GV2260, 200 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas para GV3101 y menos de 100 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas para Cry-5 y LBA4404. Las variedades de tabaco Burley 21, PM016, PM21, K149, PO1, PO2, y Simmaba produjeron mucho menos tGFP con una variación de cero a

aproximadamente 200 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas máximo en dependencia de la cepa de *Agrobacterium* usada. Las variedades de tabaco PM92 y PM204 produjeron hasta 400 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas cuando se usó AGL1 para suministrar ambas construcciones genéticas. Sorprendentemente, PM204 produce además hasta 400 mg de tGFP/kg de peso de hojas congeladas cuando se usa EHA105 pero las otras variedades de tabaco PM92 y PM181 solo producen la mitad de esta cantidad con el uso de la misma bacteria para el suministro (Figura 3B).

Conclusiones. La combinación que consiste en *A. tumefaciens* AGL1 o EHA105 que porta la construcción de interés (representada por un gen reportero de tGFP en un casete de expresión basado en HT-CPMV) y AGL1 que porta el supresor de silenciamiento (HcPro) condujo a la mayor acumulación de tGFP en este experimento. Las dos variedades de tabaco PM132 y PM204 son las que acumularon los mayores niveles de tGFP y PM132 se prueban adicionalmente para determinar la producción recombinante de un polipéptido de hemaglutinina de influenza H5 (ver el Ejemplo 8).

Ejemplo 8: Expresión transitoria de hemaglutinina H5 en *N. tabacum*

En este ejemplo, se describe la expresión transitoria de hemaglutinina H5 en una variedad de *N. tabacum* mediante el uso de agroinfiltración.

Cepas de *Agrobacterium*, construcciones genéticas y plantas. La construcción genética pC71 es un vector binario derivado de pBIN61 que comprende una secuencia codificante de un gen de hemaglutinina 5 (H5) de influenza cepa H5N1 que se ubica bajo el control de un promotor mínimo de 35S del virus del mosaico de la coliflor y 5' UTR de HT-CPMV, y en el extremo 3' del terminador de la nopalina sintasa y 3' UTR de HT-CPMV. pC120 se coinfiltra según se describió anteriormente para proporcionar el supresor del silenciamiento génico Hc-Pro. Tanto pC71 como pC120 están presentes en la misma cepa AGL1. Catorce plantas PM132 se cultivan y se infiltran con AGL1(pC71) y AGL1(pC120) según se describió antes en el Ejemplo 7.

Extracción y análisis Western. Todas las hojas se cosechan, se congelan a -80 ° C, se muelen hasta obtener un polvo y se homogenizan según se describió anteriormente. La detección de la proteína H5 producida de manera recombinante se realiza mediante transferencia Western con el uso de extractos crudos de plantas de *N. tabacum* PM132 infiltradas y plantas control de *N. benthamiana* infiltradas con la misma agrobacteria y que expresan transitoriamente la proteína H5. La Figura 4 muestra los resultados del análisis Western de extractos crudos y una banda del peso molecular esperado para H5 (75 kDa). A partir de la Figura 4 es evidente además que la intensidad de H5 es comparable para los extractos de PM132 de *N. tabacum* y *N. benthamiana*. No se detectó una banda a 75 kDa en los controles de tipo silvestre no infiltrados.

Actividad de la hemaglutinina de los extractos. La hemaglutinina tiene la capacidad de unirse al monosacárido ácido siálico que está presente en la superficie de los eritrocitos en los glóbulos rojos. La hemaglutinación puede usarse para determinar la actividad relativa de una proteína de hemaglutinina y se utiliza para determinar la actividad biológica de H5 recombinante presente en extractos crudos de PM132 de *N. tabacum* y *N. benthamiana* que expresan H5 transitoriamente según se describió antes. Se preparan diluciones en serie de 1,5 veces del extracto vegetal y se mezclan en una microplaca de 96 pocillos con glóbulos rojos. Los glóbulos rojos que no se unen a la hemaglutinina sedimentarán y se asentarán para formar un sedimento apretado. Los glóbulos rojos que se unen a la hemaglutinina forman una matriz que cubre el pocillo. Solo la hemaglutinina homotrimérica ensamblada correctamente se unirá a los eritrocitos. Un ensayo de hemaglutinación realizado en extractos de las plantas de tabaco antes mencionadas que expresan transitoriamente una proteína H5 mostró que los extractos de PM132 tenían actividad hemaglutinante lo que indica que se produce H5 trimérica plegada correctamente en *N. tabacum* PM132 infiltrada al vacío.

Ejemplo 9: Expresión transitoria del anticuerpo monoclonal rituximab

Construcción de vectores de expresión del anticuerpo monoclonal rituximab. El rituximab es un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico murino/humano que se une al CD20 humano. El rituximab se usa en el tratamiento de muchos linfomas, leucemias, rechazo de trasplantes y algunos trastornos autoinmunitarios. Un casete de expresión que comprende las secuencias codificantes completas de la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal rituximab como en el registro de CAS número 174722-31-7 o el documento WO02/060955 se construye mediante síntesis química con optimización de codones para la expresión en una célula vegetal de tabaco.

> secuencia de la cadena pesada madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148

```
caagttcaacttcaacaaccaggtgctgaacttgtaaagcctggcttctgttaagatgctcttgcaaggcttctggatacacttt
cacatcctacaacatgcattgggttaagcaaacctccaggacgtggacttgatggattggagctatctaccctggaaacggtgata
cttctacaaccagaagttcaagggaaggctactcttactgctgataagtcctcttccactgcttacatgcaactttcttcactc
acttccgaggattctgctgtttattactgcgctaggtccacttattatgggtggagattggtacttcaatggttggggagctggaac
tactgttactgtgtctgctgcttctactaagggaaccatctgtttttccacttgctccatcttctaagctacttccggtggaactg
```

ctgctcttgatgccttgtgaaggattatccccagagccagtgactgtttcttggaactctggtgctcttacttctggtgttcac
actttcccagctgttcttcagtcactctggactttactccctttcttctgttggtactgtgccatcttcttcaacttggaaactcagac
ttacatctgcaacgttaaccacaagccatctaacacaaaagtggtgataagaaggcagagccaaagtcttgtgataagactcatactt
gtccaccatgtccagctccagaacttcttgggtggtccatctgttttctgttcccaccaaagccaaaggatactctcatgatctct
5 aggaactccagaagttacttgcgttgttggatgtttctcatgaggaccagaggttaagttcaactggtacgtggatggtgttga
agttcacaacgctaagactaagccaagataggaacagtacaacttacttaccgtgttgtgtctgtgcttactgttcttcaccagg
attggcttaacggaaaagagtacaaaatgcaagggtttccaataaggcttggccagctccaattgaaaagactatctccaaggcaaaa
ggacagcctagagagccacaggtttacactcttccaccatctagagatgagcttactaagaaccagggtttcccttacttgtcttgt
10 gaagggtattctaccatctgatattgtctgttgagtggagtgcaaacggacagcctgagaacaactacaagactactccaccagtgc
ttgattctgatggttcccttcttcttactccaaactcactgtggataagtctagatggcagcagggaatgttttcttctgtctcc
gttatgcatgaggctctccataatcactacactcagaagtccttcttctgtctcctggaaagtga (Sec. con núm. de ident.:
17)

qvqlqppgaelvkgasvkmckasgytftsynmhvkwqtpgrglewigaiypngdtsynqkfkkgkatltadkssstaymqlssl
15 tsedsavyyrystyygwdyfnvwaagttvtvsaastkgspsvflapsskstsggtaalgclvkdyppevtvswngaltsgvh
tfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkaekpscdkthtccppapellggpsvflfppkpkdtlmis
rtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktpr*eqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietkiskak
gqprepqvtylppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqgnvfscs
20 vmhealhnhytqkslspspgk* (Sec. con núm. de ident.: 18)

La secuencia de la cadena pesada madura se sintetiza con un péptido señal de la patatina y se sitúa bajo el control
del promotor de HT-CPMV y las secuencias 5' y 3' UTR no traducidas de HT-CPMV como en la patente núm.
WO09/087391 y la secuencia terminadora de 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Sec. con núm. de ident.: 16: atggccactactaaatcttttaattttatgtatattagcaactactagttcaacatgtgct

es un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica al péptido señal de la patatina que se inserta en el
extremo 5' de la secuencia codificante de la cadena pesada inmunoglobulínica en pC148.

La cadena ligera con el péptido señal de la patatina se ubica bajo el control de una secuencia promotora y una
terminadora de plastocianina como en la patente WO01/25455.

> secuencia de la cadena ligera madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148

cagattgtgctttctcagtcctccagctattctttctgcttccccaggtgaaaaggttacaatgacttgccgtgcttcttcttctgt
35 gtccctacattcattggttccaacagaagccaggatcttctccaaagccatggatctacgctacttctaacttgccttctggtgttc
cagttaggttttctggatctggatctggtacttcttactcccttactattcttagagtggaggctgaagatgctgctacttactac
tgccaacagtggaacttctaataccaccaactttcggagggtggaactaagcttgagatcaagaggactgttgcgtgctccatctgtgtt
tattttcccaccatctgatgagcaacttaagtctggaactgcttctgttgtgtgccttctcaacaatttctacccaagggagcta
40 aggttcagtggaagtgataatgctctccagtcctggaattctcaagagtcctgtgactgagcaggattctaaggattccacttac
tcccttcttcttactcttactcttccaaggctgattatgagaagcacaaggtttacgcttgcaagttactcatcagggactttc
ttcaccagtgacaaaagtccttcaaccgtggagagtgttga (Sec. con núm. de ident.: 20)

qivlsqspailsaspgkvmtcrasssvsyihwfqkpgsspkpwiatsnlasgvpvrfsgsgsgtsysltisrveaadaatyy
45 cqqwtsnpptfgggtkleikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqkwkdnlqsgnsqesvteqdsdsty
slsstltlskadyekhkvacevthqglsspvtksfnrgec* (Sec. con núm. de ident.: 21)

El extremo 5' de la secuencia codificante de la cadena ligera inmunoglobulínica en pC148 se une a una secuencia
de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 17 que codifica al péptido señal de la patatina, en donde el uso de
50 codones se ha optimizado para la expresión en tabaco.

atggccactactaagtccttcttcttcttcttcatgatcttgctactacttcttctacatgtgct (sec. con núm. de ident.: 17)

Ambos casetes de expresión se clonan en la parte del T-ADN de pC100 según se describió en el Ejemplo 2 para
55 generar pC148. pCambia-2300 (GenBank: AF234315.1; Hajdukiewicz y otros, 1994. Plant. Mol. Biol. 25: 989-994) se
amplifica por PCR mediante el uso de los iniciadores PC201F (5' -agaaggccttccgggacggcgtcag-3' ; sec. con núm.
de ident.: 6) y PC202R (5' -atggcgcgccccctcgggatca-3' ; sec. con núm. de ident.: 7) lo que da lugar a sitios de
escisión de endonucleasas de restricción StuI y AclI únicos. El fragmento pCambia-2300 se liga al fragmento de
60 StuI/AclI de pC148 que comprende el casete de expresión de rituximab para generar pCambia-Rituximab.

La invención contempla vectores de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes y según se describió
anteriormente que comprenden, en la región del T-ADN y unida operativamente a un elemento regulador en plantas,
una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada madura de una inmunoglobulina que se une al CD20
humano que muestra al menos 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con la sec.
65 con núm. de ident.: 18.

La invención contempla además vectores de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes y según se describió anteriormente que comprenden, en la región del T-ADN y unida operativamente a un elemento regulador en plantas, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera madura de una inmunoglobulina que se une al CD20 humano que muestra al menos 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 20.

Infiltración de plantas de Nicotiana benthamiana. Todos los vectores binarios usados en este estudio se introducen en AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias se cultivan en medio YEB que comprende extracto de carne 2 g/l, extracto de levadura a 0,4 g/l, Bacto-peptona a 2 g/l, sacarosa a 2 g/l, MgSO₄ a 0,1 g/l y los antibióticos adecuados para la selección de la cepa respectiva de *Agrobacterium* y el vector binario, en un matraz Erlenmeyer a 28 °C y 250 rpm en un agitador giratorio hasta una DO₆₀₀ >1,6. El cultivo se diluye después 1:100 en medio LB Broth Miller fresco que contiene MES 10 mM y antibióticos adecuados y se cultiva adicionalmente a 28 °C y 250 rpm en un agitador giratorio hasta una DO₆₀₀ >2. Después del cultivo, las bacterias se recolectan mediante centrifugación a 8000 g y 4 °C durante 15 min. Las bacterias sedimentadas se resuspenden en solución de infiltración a una DO₆₀₀ > 2. Las plantas de *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas de edad se coinfiltran con células de la cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*, una que contiene (i) un supresor de silenciamiento génico p19 expresable del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) (Swiss-Prot P50625); y las otras (ii) pC148 o pCambia-Rituximab, a una relación 1:1 y una DO₆₀₀ final=0,3. La secuencia codificante para el supresor de silenciamiento génico p19 del TBSV está bajo el control de una secuencia promotora y terminadora de 35S del virus del mosaico de la coliflor doble en pBin19 (Bevan MW (1984) Nucleic Acids Res. 12: 8711-8721). La infiltración al vacío, la cosecha y el muestreo del material se llevan a cabo según se describió en el Ejemplo 1 excepto que el tampón de extracción contiene Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 0,1 % Triton X-100, Urea 4 M y DTT 2 mM. La expresión del anticuerpo monoclonal rituximab se cuantifica en los extractos solubles mediante ELISA. Las placas de microtitulación (Immulon 2HB, Thermofisher) se recubren durante la noche a 4 °C con un anticuerpo de captura (anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón específico para la cadena pesada Sigma, núm. M8770) a una concentración de 2,5 µg/ml. Una curva estándar (4 - 80 ng/ml) se prepara mediante el uso de una proteína control IgG1 de ratón (Bethyl, núm. M110-102) en extracto de simulación (preparado a partir de material de hojas infiltradas solo con la suspensión bacteriana del supresor de silenciamiento génico p19). Los extractos solubles se diluyen 1:1000 en tampón de dilución (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,1 % de Triton X-100) y los estándares y las muestras se cargan por triplicado y se incuban durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo para la detección es un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa específico para Fc de Jackson ImmunoResearch (núm. 115-035-205) que se usa a una dilución de 1:40 000 y se incuba durante 1 hora a 37 °C. El total de proteína soluble en los extractos se determina mediante el uso del reactivo del ensayo Coomassie-Plus de Pierce (núm. 24236). Los resultados de los seis experimentos para cada una de las combinaciones, pC148 con el supresor de silenciamiento génico p19 y pCambia-Rituximab con el supresor de silenciamiento génico p19, indican que la expresión promedio de rituximab en hojas de *Nicotiana benthamiana* es de 136,30 mg/kg peso fresco (FW) de de hojas para pC148 en comparación con 122,60 mg/kg FW para pCambia-Rituximab.

Ejemplo 10: Expresión transitoria de la partícula similar a H5 de virus de la influenza en el tabaco

Construcciones genéticas. El gen que codifica para el supresor del silenciamiento génico HcPro de un aislado del virus del grabado del tabaco (TEV) TEV7DA (GenBank: DQ986288.1) se clona en el sitio único de EcoRI de pC100 para generar pC120. La secuencia codificante está bajo el control de un promotor doble de 35S del virus del mosaico de la coliflor, la región 5' no traducida de TEV7DA y la secuencia terminadora de la nopalina sintasa, Segmento 4 de de hemaglutinina del virus H5N1 (GenBank: EF541394.1) que comprende la secuencia codificante para la hemaglutinina madura H5, se clona bajo el control de un promotor mínimo de 35 del virus del mosaico de la coliflor, y las regiones no traducidas 5' y 3' de HT-CPMV y la secuencia terminadora de la nopalina sintasa en el sitio de EcoRI único de pPMP1 (ver el Ejemplo 2) que da como resultado pC229.

Infiltración de plantas de Nicotiana tabacum y preparación de las muestras. Todas las construcciones genéticas se introducen en *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Las plantas de *Nicotiana tabacum* se cultivan en el invernadero en bloques de lana de roca con un período de luz de 20 horas, un período de oscuridad de 4 horas, temperatura de día/noche de 26 °C/20 °C y humedad relativa de 70 %/50 % día/noche. Las bacterias se cultivan según se describió en el Ejemplo 9 hasta una DO₆₀₀ final de 3,5. Los cultivos de *Agrobacterium* que contienen una construcción genética pC229 y una construcción genética del supresor de silenciamiento pC120 se mezclan a una relación de 3:1 y se diluyen hasta una DO₆₀₀=0,8 en la solución de infiltración. Las plantas se infiltran al disminuir la presión de aire a 900 mbar por debajo de la presión atmosférica en 15 s, un tiempo de mantenimiento de 60 s seguido del regreso a la presión atmosférica en aproximadamente 2 s. Las hojas de las plantas infiltradas se recolectan a partir de 10 plantas a los 5 días después de la infiltración y se homogenizan mediante el uso de una prensa de tornillo (Green Star Corrupad, GS 1000, Corea Co.). Se añade metabisulfito de sodio a una concentración final de 10 mM para reducir la oxidación de las muestras. El pH del extracto se ajusta a pH 5,3 y posteriormente se incuba a temperatura ambiente durante 20-30 min sin agitación. Después se añade Celpure P300 (Sigma-Aldrich) (10 %) al extracto y se mezcla durante 1 minuto. La solución se filtra a través de un papel de filtro Whatman recubierto previamente con la solución acuosa Celpure P300 (10 % Celpure P300 en metabisulfito de sodio 10 mM).

Para la ultracentrifugación, se preparan tres almohadillas de sacarosa en tubos de ultracentrífuga de la siguiente manera: 1) 3 ml de 80 % de sacarosa; 2) 1,5 ml cada uno de 60 y 45 % de sacarosa; y 3) 1 ml cada uno de 60, 45 y 35 % de sacarosa. Las muestras clarificadas y filtradas del extracto (hasta 13 ml) se colocan suavemente sobre la parte superior de los gradientes de sacarosa y se someten a ultracentrifugación en un rotor tipo de cubeta oscilante (Sorvall Surespin 630; Kendro) a 24,000 rpm durante 1 hora a 4 ° C (135,000 RCFmax). Las muestras concentradas de sacarosa se filtran previamente mediante el uso de un filtro de 0,45 µm y se someten a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en condiciones isocráticas en un sistema de cromatografía AKTA automatizado. El tampón de corrida es TBS, pH 7,5 y el tamaño de muestra es de 4 ml bajo un régimen de flujo de 1 ml/min en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare, 17-1069-01). Las fracciones que contienen H5 purificada se mezclan y concentran hasta aproximadamente 0,3 mg/ml mediante el uso de un dispositivo de membrana de ultrafiltración con corte en 30 kDa Centricon (Millipore) y se analizan posteriormente.

Electroforesis en gel y transferencia Western. Las muestras de las fracciones mezcladas se someten a SDS-PAGE, transferencia Western y PAGE nativa Azul mediante el uso de técnicas estándar. SDS-PAGE es en un gel de SDS-PAGE al 4-12 %. Como control (Ctrl+) se usa H5 recombinante disponible comercialmente (Immune Technology Corp., Nueva York, cat. núm. IT-003-0052p). Después de la separación, las proteínas se tiñen con una tinción de proteínas M Imperial (Pierce núm. 24615). Para la transferencia Western, el anticuerpo primario es un anticuerpo de conejo anti-HA (H5N1 VN1203/04 núm. IT 003-005V, Immune Technology Corp., Nueva York). Para la detección, se usa un fragmento FC de cabra anti IgG de conejo affiniPure marcado con HRP (Jackson Laboratories, núm. 111-035-046). La detección se realiza por quimioluminiscencia mediante el uso de un kit Immuno-star HRP Chemiluminescent (BIO-RAD Laboratory, 170-5040). Los resultados se capturan mediante el uso de Chimio-Capt 3000 y muestran la presencia de H5 en los extractos de plantas infiltradas con la construcción genética pC229. El peso molecular es similar al de la H5 recombinante comercial. Se realiza PAGE nativa en geles de poliacrilamida con Bis-Tris 4-16 % premoldeados (Novex, Invitrogen, Estados Unidos). Para cargar, las muestras se tratan con digitonina en el tampón de muestras para la electroforesis nativa en gel de poliacrilamida (PAGE) y se incuban durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se añade el aditivo para las muestras G-250 de PAGE nativa (Novex, Invitrogen, Estados Unidos) a una concentración final de 0,5 % y las muestras se cargan y se corren en un gel PAGE con Bis-Tris al 4-16 %. Los geles se corren a 4 °C a 150 V constante durante los primeros 60 min. Posteriormente, se incrementa el voltaje a 250 V durante otros 30 min y los geles se tiñen con tinción de proteína M Imperial. Los resultados de PAGE nativa y transferencia Western muestran la expresión exitosa de H5 después de una expresión transitoria en tabaco.

Hemaglutinación. La hemaglutinina trimérica natural (HA), tal como la proteína H5, tiene la capacidad de unirse al monosacárido ácido siálico, que está presente en la superficie de los eritrocitos (glóbulos rojos). Esta propiedad conocida como hemaglutinación es la base de un ensayo rápido y se usa aquí para determinar la actividad biológica de la proteína recombinante. La actividad hemaglutinante de H5 producida en tabaco se mide por incubación de diluciones en serie de 1,5 veces del extracto vegetal, así como extracto purificado por cromatografía de exclusión por tamaño en una placa de 96 pocillos con una cantidad específica de glóbulos rojos. Los glóbulos rojos no unidos a H5 se hunden en el fondo de un pocillo y forman un precipitado. Es importante señalar que solo la H5 ensamblada correctamente como homotrímero se unirá a los eritrocitos. La actividad hemaglutinante se observa en extractos de plantas de tabaco infiltradas con la construcción genética pC229, así como en las fracciones de PC229 enriquecidas mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 11: Optimización de la densidad del inóculo para la transfección de tabaco

Los siguientes experimentos describen la optimización de los métodos de la invención. Se analizan tres factores: (i) la concentración final de bacterias en el inóculo (que se encuentra en el intervalo de 0,05 a 0,85), (ii) la relación de la construcción de interés (COI) y el supresor del silenciamiento SoS, es decir COI:SoS (que se encuentra en el intervalo de 3,00 a 0,33); (iii) y las variedades de tabaco usadas en la expresión (Burley 21, PM132 y PM204 de *N. tabacum*). El nivel de expresión de TurboGFP en las hojas infiltradas se mide a los 6 días después de la infiltración (DPI). El experimento usó un diseño de compuesto central circunscrito con 4 puntos centrales (DO600= 0,45, relación COI:SoS= 1,67:1) y 3 réplicas para un total de 48 corridas. Como controles, tres plantas no infiltradas de cada variedad se cultivan en el mismo compartimento y condiciones que las plantas infiltradas.

Preparación del inóculo. Dos cultivos de *Agrobacterium* de AGL1 que alberga los casetes de expresión para el gen reportero de tGFP (A91) como COI, y el supresor del silenciamiento HcPro (A120) como SoS se cultivan en LB Miller "sin compuestos de origen animal" (NaCl 10 g/l + Triptona vegetal 10 g/l + extracto de levadura 5 g/l), suplementado con carbenicilina y kanamicina, hasta una densidad óptica final (DO600) de 2,0. Las bacterias se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en solución de infiltración según se describió anteriormente. En el día de la infiltración, los inóculos concentrados de A91 y A120 se mezclan entre sí a tres relaciones diferentes, 3:1, 1,67:1 y 1:3 y se diluyen en solución de infiltración hasta una DO600 final de 0,85 cada uno. Los tres inóculos se equilibran durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tres inóculos a DO600 = 0,85 se diluyen secuencialmente más aun a DO600 = 0,45 y 0,05 en solución de infiltración para evaluar los efectos del uso de menores densidades bacterianas.

Infiltración mediada por Agrobacterium y cosecha de la biomasa. Las plantas de tabaco se infiltran, se incuban y se cosechan según se describió en el Ejemplo 1. La extracción y cuantificación de tGFP se realizan según se describió en el Ejemplo 3. Una curva estándar se prepara mediante la adición de proteína control TurboGFP (Evrogen) en un intervalo de concentración de 4000 a 125 ng/ml a un extracto no infiltrado diluido 1:50 final en tampón de extracción.

Resultados. Para determinar si la DO₆₀₀ de *Agrobacterium* y la relación COI:SoS influye sobre los niveles de expresión de tGFP en variedades de *N. tabacum*, se realiza un conjunto limitado de experimentos en los que ambos factores se varían simultáneamente. Las plantas de tabaco de las variedades Burley 21, PM132 y PM204 se infiltran con A91 y A120 a DO₆₀₀ de 0,85, 0,45 y 0,05 y a relaciones COI:SoS de 3,00, 1,67 y 0,33. Como era de esperar a partir de los experimentos anteriores, la respuesta de estrés a la agroinfiltración como el amarillamiento de las hojas se observa a los 6 DPI en las tres variedades de tabaco probadas. Los síntomas aumentaron con la densidad bacteriana en el inóculo. La variedad Burley 21 mostró un amarillamiento de las hojas más pronunciado incluso a la menor densidad. Pequeñas lesiones necróticas son visibles en las hojas de PM132 y PM204 infiltradas con el inóculo a DO₆₀₀= 0,85, pero se limitan principalmente a la parte basal de las hojas. Los síntomas de estrés se deben principalmente a la densidad del inóculo y no se observa un efecto evidente de la relación COI:SoS.

A continuación, se usa un modelo de regresión, que es confiable para las tres variedades de tabaco, para interpolar la expresión de tGFP dentro del espacio experimental. Los resultados mostraron ser estadísticamente relevantes. A pesar de los síntomas observados, la cuantificación fluorimétrica de TurboGFP no muestra una correlación negativa entre la respuesta de estrés de las plantas con el aumento de la densidad óptica y los niveles de expresión dentro del intervalo de prueba. Las hojas que muestran un fuerte amarillamiento o incluso lesiones necróticas a las OD altas todavía expresan niveles más altos de tGFP que a las OD bajas. La respuesta predicha a la densidad del inóculo y la relación COI:SoS es similar para las tres variedades de tabaco y para las tres puede lograrse una máxima expresión a densidades ópticas altas de *Agrobacterium* en el inóculo y relación COI:SoS alta (Figura 5), lo que confirma que ambos factores influyen en la expresión transitoria de la proteína recombinante. Los mayores niveles de expresión se observaron para PM132 y PM204 (Figura 5 B y C).

Los parámetros óptimos que se identifican para cada una de las tres variedades son: DO₆₀₀= 0,69; COI:SoS=2,40 para Burley 21, DO₆₀₀= 0,7428; COI:SoS=2,8058 para PM132 y DO₆₀₀= 0,6729; COI:SoS=2,0805 PM204. Estos parámetros produjeron 215, 698 y 603 mg de tGFP por kg de peso congelado, respectivamente. Sin embargo, los valores óptimos predichos para PM132 están casi fuera de las condiciones escogidas para este experimento (Figura 5 B). Por lo tanto, se realiza un segundo experimento con el uso de una DO₆₀₀ final del inóculo que se encuentra en el intervalo de 0,6 a 1,2 y una relación COI:SoS que se encuentra en el intervalo de 2,0 a 4,5. En este caso la reproducibilidad del modelo es baja, lo que significa que existe un error puro grande con alto nivel de ruido, lo que indica sin embargo la existencia de una meseta alrededor del óptimo predicho en el primer experimento.

Con el uso de un ANOVA con un procedimiento de modelo lineal general para comparar todos los posibles pares de medias de los niveles, el mejor modelo incluyó las interacciones y la prueba indicó que el nivel de expresión de tGFP en PM132 es significativamente mayor que los de Burley 21 y PM204.

Antes de la optimización, las condiciones estándar usadas fueron DO₆₀₀= 0,32 y una relación de COI:SoS= 1,00. Una expresión de la proteína recombinante de 2,0-2,5 veces más alta se logra al aumentar tanto la concentración de las células de *Agrobacterium* en el inóculo como la relación de la construcción de interés con respecto al supresor de silenciamiento.

Ejemplo 12: Mejora de la escalabilidad de la preparación del inóculo para la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium*.

Material vegetal. Lotes regulares de plantas de *N. tabacum* Burley 21, PM132 y PM204 se cultivan a una densidad de 35 plantas/m² en el compartimento A del invernadero en bloques de lana de roca con un período de 20 horas de luz, temperatura de 26 °C/20 °C día/noche y humedad relativa de 70 %/50 % día/noche. Las plantas se fertilizan-irrigan por subirrigación.

Preparación del inóculo de Agrobacterium. Los cultivos de *Agrobacterium* de la cepa AGL1 que alberga los casetes de expresión para el gen reportero de tGFP (A91) o para el supresor de silenciamiento HcPro (A120) se cultivan en LB Miller "sin compuestos de origen animal" (NaCl 10 g/l + Triptona vegetal 10 g/l + extracto de levadura 5 g/l), suplementado con carbenicilina y kanamicina, hasta una DO₆₀₀ final de >2,0 (si no se indica de cualquier otra manera). En dependencia de las condiciones de prueba como se describen más adelante, las bacterias se cosechan por centrifugación y se resuspenden en solución de infiltración a DO₆₀₀ > 2,0, o las bacterias se mantienen en medio de cultivo para generar inóculos concentrados. En el día de la infiltración, los inóculos concentrados de A91 y A120 se mezclan en una relación de 1:1, se diluyen en solución de infiltración a una DO₆₀₀ final de 0,32 y se equilibran durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Infiltración mediada por Agrobacterium y cosecha de la biomasa. Las plantas de tabaco se infiltran, se incuban y se cosechan según se describió en el Ejemplo 1. La extracción y cuantificación de tGFP se realizan según se describió

en el Ejemplo 3. Una curva estándar se prepara mediante la adición de proteína control TurboGFP (Evrogen) en un intervalo de concentración de 4000 a 125 ng/ml a un extracto no infiltrado diluido 1:50 final en tampón de extracción.

Determinación del contenido total de proteína soluble. El contenido total de proteína soluble (TSP) en los extractos se determina mediante el uso del reactivo del ensayo Coomassie-Plus (Pierce) por mediciones de absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm. Los extractos se diluyen 1:20 en agua ultrapura y se cargan 10 µl por triplicado en una microplaca de fondo plano.

Resultados. En primer lugar, se investiga la posibilidad de preparar el inóculo final mediante dilución directa de los cultivos de *Agrobacterium* en solución de infiltración. Como se muestra en la Figura 6, la expresión transitoria de tGFP en el tabaco infiltrado Burley 21, PM132 y PM204 no se afecta por la omisión de la etapa de centrifugación/resuspensión. Además, las plantas de PM132 y PM204 infiltradas con un inóculo preparado directamente a partir de cultivos líquidos incluso conduce a una expresión de tGFP significativamente mayor. Notablemente, los niveles de expresión en PM132 y PM204 son similares en ambas condiciones y, por lo tanto, los otros experimentos se realizan con el uso de PM132 solamente.

Después de la centrifugación y resuspensión en la solución de infiltración no nutritiva, los inóculos se almacenan usualmente durante hasta seis días a 4 ° C sin ningún cambio significativo en la eficacia de la transfección ni los niveles de expresión transitoria. Sin embargo, la omisión de las etapas de centrifugación y resuspensión plantea cuestiones de las condiciones de almacenamiento y el período de tiempo de almacenamiento. Comúnmente se asume que las células de *Agrobacterium* almacenadas en medio LB se mantienen esencialmente en un ambiente nutritivo rico que podría continuar promoviendo el crecimiento bacteriano y, como resultado, conduce a la degradación del cultivo. En una próxima etapa, se analiza la estabilidad del almacenamiento del inóculo no centrifugado. Los cultivos concentrados de A91 (tGFP) y A120 (SoS) a una $DO_{600} > 2,0$ se almacenan durante 5 a 0 días a 4 ° C y se diluyen poco antes de la infiltración. Un inóculo preparado a partir de cultivos centrifugados se usa como control positivo. La cuantificación de los niveles de tGFP a los 6 días después de la infiltración indica que el inóculo no centrifugado es estable durante 5 días a 4 ° C sin ningún cambio en la eficacia de expresión en comparación con un inóculo almacenado durante 1 día. Sorprendentemente, el uso del inóculo preparado a partir de cultivos frescos dio como resultado una menor expresión de tGFP cuando se compara con los cultivos que se han almacenado, lo que sugiere que un tiempo de almacenamiento corto a 4 ° C es necesario para la inducción de la virulencia de *Agrobacterium* y la transfección óptima. Estos resultados confirman además que el inóculo no centrifugado es significativamente y sorprendentemente más eficaz que el inóculo centrifugado para producir mayores niveles de proteína recombinante.

El crecimiento bacteriano en cultivo líquido se caracteriza por las cuatro fases sucesivas: fases de retraso, logarítmica, estacionaria y muerte. Durante la fase logarítmica, las bacterias son metabólicamente activas y crecen rápidamente hasta que alcanzan la fase estacionaria, donde se agotan uno o más nutrientes en el medio y limita el crecimiento posterior. Para una transformación exitosa, las bacterias se recolectan usualmente en una fase logarítmica temprana o media. Los experimentos pilotos se llevan a cabo con el objetivo de determinar la curva de crecimiento de la cepa AGL1 de *Agrobacterium*. Los datos muestran que la fase logarítmica se produce entre una $DO_{600} = 0,3$ y $DO_{600} = 3,8-4,0$, antes de entrar en la fase estacionaria. Para disminuir el volumen del cultivo necesario en la preparación del inóculo final, se analiza si el uso de cultivos llevados hasta la fase logarítmica tardía, es decir a densidades mayores, podría afectar los niveles de expresión en tabaco. Las plantas de tabaco PM132 se infiltran con un inóculo preparado a partir de cultivos con una DO_{600} usual de 2,0 o a una DO_{600} de 3,8 y se diluyen directamente en la solución de infiltración. Sorprendentemente, el análisis de los niveles de tGFP a los 6 días después de la infiltración indica que la expresión transitoria no se afecta por el uso de cultivos de *Agrobacterium* en la fase logarítmica tardía para la preparación del inóculo.

En conjunto, estos datos demuestran que el escalado de la preparación del inóculo para la transformación transitoria de tabaco mediada por *Agrobacterium* puede facilitarse grandemente, sin afectar la expresión transitoria de las proteínas recombinantes, mediante el uso de cultivos con altas densidades celulares (hasta $DO_{600} = 3,8$) así como mediante la omisión de las etapas de centrifugación y resuspensión cuando se prepara el inóculo.

Ejemplo 13: Aumento de la expresión de proteínas recombinantes mediante la incubación de plantas de tabaco infiltradas en una posición invertida.

Este ejemplo describe el descubrimiento sorprendente de que la incubación de una planta de tabaco infiltrada en una posición invertida conduce a una mayor expresión de la proteína recombinante. El descubrimiento se hizo durante la búsqueda de una solución al problema de que las plantas de tabaco infiltradas, especialmente cuando se incuban a altas densidades en un invernadero, tienden a caerse porque no pueden sostener el peso de las hojas infiltradas. La solución proporcionada es la incubación de las plantas infiltradas en posición vertical hacia abajo. Sorprendentemente, la incubación de las plantas infiltradas en posición invertida dio como resultado un aumento significativo en la producción de proteína recombinante en comparación con las plantas de tabaco incubadas en la posición vertical hacia arriba normal.

Las plantas de tabaco se infiltran al vacío con células de la cepa AGL1 de *Agrobacterium* que alberga ya sean los plásmidos pC91 que comprenden el casete de expresión de tGFP o pC71 que comprende el casete de expresión de H5, según se describió anteriormente. Todas las plantas de tabaco se coinfiltran además con pC120 que comprende un supresor de silenciamiento génico HcPro expresable según se describió anteriormente.

Las plantas y la infiltración. Las plantas de *N. tabacum* PM132 de cinco a seis semanas de edad cultivadas en lana de roca y todas de aproximadamente 28 cm de altura, se infiltran al vacío según se describió antes con células de la cepa AGL1 de *Agrobacterium* que alberga ya sean los plásmidos pC91 que comprenden el casete de expresión de tGFP o pC71 que comprende el casete de expresión de H5, según se describió anteriormente. Todas las plantas de tabaco se coinfiltran además con pC120 que comprende un supresor de silenciamiento génico HcPro expresable según se describió anteriormente.

Inmediatamente después de la infiltración, las plantas infiltradas se incuban en posición vertical hacia abajo a la vez que la iluminación se proporciona desde arriba de las plantas en un invernadero. A los 4 y 6 días después de la infiltración, se cosechan 4 plantas de cada grupo de tratamiento y tres discos de hojas por planta se usan para medir la expresión de tGFP. Los discos de hojas se congelan en nitrógeno líquido y se muelen hasta obtener un polvo fino en un tubo eppendorf de 2 ml y la extracción de tGFP se realiza según se describió anteriormente. Para la cuantificación de la expresión de tGFP, 5 µl de cada uno de los extractos se diluyen hasta 200 µl y se mide la fluorescencia según se describió. Se realizan tres réplicas.

Resultados. Las plantas no mostraron síntomas de estrés por agua. Pocos días después de colgar las plantas hacia abajo, los tallos de las plantas se doblan hacia la luz que brillaba en una posición muy por encima, formando una estructura en forma de gancho. En la Figura 7 puede observarse que la expresión de tGFP y la fluorescencia es como promedio dos veces mayor para las plantas incubadas en una posición invertida (es decir, hacia abajo) en comparación con las plantas tratadas normalmente que se incuban en una posición vertical hacia arriba (Figura 7).

Ejemplo 14. Aumento de la expresión de tGFP y H5 al aumentar la densidad de cultivo de plantas de tabaco antes de la infiltración

Este ejemplo describe el sorprendente efecto de cultivar plantas de tabaco antes de la infiltración a una densidad alta sobre la expresión de tGFP y H5 recombinante. El experimento muestra que dos variedades de tabaco PM132 y PM217 cuando se cultivan a una densidad alta antes de la infiltración, sorprendentemente produjeron aproximadamente 40 % más de tGFP y 70 % más de H5 recombinante, sobre la base del peso de la biomasa infiltrada con respecto a las plantas cultivadas a menores densidades cuando se incuban en condiciones de posición vertical hacia arriba normal.

Plantas e infiltraciones. Para estudiar los efectos de cultivar tabaco a diferentes densidades de siembra, las plantas de *Nicotiana tabacum* PM132 y PM217 se cultivan a dos densidades: 25 y 100 plantas por metro cuadrado. En el día 46 después de la siembra, las plantas se infiltran al vacío con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* que comprende ya sea pC91 que contiene el casete de expresión de tGFP o pC71 que contiene el casete de expresión de H5, y cada uno junto con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* que comprende pC120 que contiene el supresor del silenciamiento génico HcPro, según se describió antes. La DO₆₀₀ final usada en la infiltración es de 0,32. Para las plantas cultivadas a ambas densidades, la altura promedio de las plantas, el diámetro de los estomas, el contenido de clorofila, el espesor de las hojas y el contenido de agua se miden antes de la infiltración. Como puede observarse en la Tabla 3, las plantas cultivadas a altas densidades son más grandes, tienen menos clorofila y hojas más delgadas, pero el diámetro de los estomas es el mismo. Para PM132, el contenido de agua es el mismo para las plantas cultivadas a densidad baja o alta pero para PM217, el contenido de agua es mucho menor cuando se cultivan a baja densidad. Después de la infiltración, la mitad de las plantas se incuban en posición vertical hacia arriba o invertidas (hacia abajo). Las mediciones se realizan en un total de 9 (nueve) plantas por tratamiento distribuidas en tres réplicas de cada 3 plantas.

Resultados. Las hojas se cosechan 5 días después de la infiltración, se prepara un extracto y se realiza un análisis de la expresión de tGFP, según se describió anteriormente. El extracto se diluye 1:1 en tampón de GFP y se mezclan 5 µl con 200 µl de tampón de GFP para la cuantificación de fluorescencia. La expresión de H5 recombinante se cuantifica mediante ELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Como puede observarse en la Tabla 4, la expresión de tGFP en mg/kg de peso fresco de la biomasa de hojas para ambas variedades cuando se incuban en posición vertical hacia arriba normal, es como promedio 41 % mayor para las plantas cultivadas a una densidad alta antes de la infiltración en comparación con las plantas cultivadas a una densidad baja. Resultados similares se obtienen para H5 que mostró un aumento promedio de la expresión cuando se cultivaron a una densidad alta entre 21-40 % en comparación con plantas cultivadas a densidad baja e incubadas en posición vertical hacia arriba normal después de la infiltración. Para estudiar los efectos de la incubación invertida sobre la expresión de tGFP y H5, la mitad de las plantas infiltradas se incuban en una posición invertida después de la infiltración. Como puede observarse en la Tabla 4, existe un aumento significativo de la expresión de tGFP y H5 para las plantas incubadas en una posición invertida y cultivadas a una densidad baja pero un aumento de la expresión mucho menor para las plantas cultivadas a una densidad alta antes de la infiltración. Para las plantas

PM132 cultivadas a una densidad baja en una posición invertida, da como resultado un aumento del 40 % de tGFP y 71 % de H5. Para las plantas cultivadas a una densidad alta antes de la infiltración, el aumento es de solo 3 % para tGFP y 7 % para H5, en comparación con las plantas incubadas en una posición vertical hacia arriba normal. Se establece el total de proteína soluble (TSP) y la expresión de tGFP y H5 se estima con respecto al TSP. La expresión de tGFP y H5 es siempre mayor para las plantas cultivadas a densidades altas e incubadas en una posición invertida. En una posición vertical hacia arriba, las plantas cultivadas a una densidad baja tuvieron un aumento en la expresión de tGFP de aproximadamente 10,5 %. Para las plantas cultivadas a densidad alta, the aumento es aproximadamente 13,6 %. Para H5, el aumento en el rendimiento para las plantas incubadas en posición vertical hacia arriba y cultivadas a una densidad baja antes de la infiltración es de 0,25 %, mientras que el aumento en el rendimiento para las plantas cultivadas a una densidad alta es de 0,37 %. Tanto para tGFP como para H5, la incubación en una posición invertida dio como resultado un aumento de la expresión (según se midió en porcentaje de TSP). Para las plantas cultivadas a una densidad baja, la incubación en una posición invertida dio como resultado un aumento de la biomasa de 40-60 %. Para las plantas cultivadas a una densidad alta, la incubación en una posición invertida dio como resultado un aumento de 20 %. Para tGFP el mayor rendimiento de proteína es de 16,2 % y se obtiene cuando las plantas se cultivan a una densidad alta antes de la infiltración y se incuban en una posición invertida. Esto representó un aumento de 54 % en el rendimiento de proteína en términos de % de TSP en comparación con las plantas cultivadas a una densidad baja e incubadas en posición vertical hacia arriba normal (10,5 % de TSP).

Para evaluar si la reducción de la luz que alcanza la superficie superior de las hojas de plantas cultivadas a densidades altas e incubadas en una posición invertida podría haber provocado el incremento de la expresión, las plantas infiltradas con el vector de expresión de tGFP se incuban en oscuridad total. Sorprendentemente, los datos indican que la incubación en oscuridad total es perjudicial para la expresión de tGFP. Como puede observarse en la Figura 18, las plantas incubadas en la oscuridad produjeron como promedio 45 % menos tGFP en comparación con las plantas cultivadas en la luz.

Se realizaron experimentos adicionales para investigar el efecto de tres densidades de cultivo mayores, 122, 529 y 961 plantas por m² sobre la producción de biomasa en PM132. Los experimentos se llevaron a cabo en un diseño en bloque aleatorizado completo con cinco réplicas. El sustrato de cultivo fueron bloques de lana de roca que medían 30 cm x 30 cm x 7 cm y se fabricó un plantador de madera de acuerdo con las densidades de siembra. Los plantadores se presionaron en los bloques para crear pequeñas hendiduras de aproximadamente 5 mm de profundidad. Las plántulas se trasplantaron a los bloques manualmente. El área completa de 30 cm x 30 cm del bloque contenía plantas espaciadas para lograr la densidad deseada, pero en el momento de la infiltración, solo se infiltraron las plantas situadas en el área media de 15 cm x 15 cm. Esta práctica permitió la formación de bordes alrededor de la zona media para eliminar cualquier efecto del borde. Antes de la infiltración, las plantas del borde se cortaron y descartaron. Las infiltraciones se realizaron en las plantas en dos etapas del desarrollo, altura de la planta de 25 cm y 35 cm. Las plantas infiltradas se incubaron en el invernadero durante 5 días en posición normal o invertida.

Un inóculo se preparó según se describió anteriormente excepto que la relación del cultivo de AGL1 que porta el casete de expresión de TurboGFP con respecto al cultivo de AGL1 que porta HcPro fue de 3:1 y la DO600 final fue de 0,8. Las plantas se infiltraron bajo presión de 50 mbar que se alcanzó en 1 minuto 45 segundos y se liberó rápidamente en 1,5 segundos.

Cinco días después de la infiltración, se realizaron mediciones de biomasa total, peso de hojas y tallos frescos, grosor de las hojas y otras mediciones de biomasa. Los materiales de plantas completas que incluyen los tallos se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C.

Las características de la biomasa de las plantas de tabaco sembradas a 122, 529 y 961 plantas por m² indicaron que a estos intervalos de densidad de siembra, no se observaron diferencias significativas en la altura promedio de la planta, el % de biomasa en hojas y el grosor de las hojas. Sin embargo, existe una disminución en el peso de las plantas individuales con el aumento de la densidad aunque el % de biomasa en hojas permaneció relativamente constante. Un aumento en la biomasa por unidad de área de cultivo se observó en ambos puntos de tiempo a la densidad de 529 plantas/m². Un rendimiento máximo de aproximadamente 5 kg de peso fresco de hojas por m² o 10 kg de biomasa total por m² se obtuvo cuando las plantas se infiltraron cuando su altura fue de 35 a 45 cm y se sembraron a 529 plantas/ por m². El rendimiento de TurboGFP por unidad de área se obtuvo al multiplicar la concentración de TurboGFP en la biomasa por los rendimientos calculados de biomasa por metro cuadrado. El mayor rendimiento de TurboGFP por unidad de área se obtuvo a una densidad de 529 plantas/ por m². Otro aumento en la densidad de siembra a 961 plantas por m² tuvo un impacto negativo sobre el rendimiento de la proteína recombinante.

Ejemplo 15. Aumento de la expresión de proteínas recombinantes mediante incubación en condiciones de día corto después de la infiltración

Este ejemplo describe el resultado de un experimento en donde las plantas de tabaco se incuban en condiciones de día corto (8 horas de luz por día) y largo (20 horas de luz por día) después de la infiltración. El experimento muestra

que para las plantas incubadas en posición vertical hacia arriba normal así como hacia abajo, la expresión de tGFP mejora grandemente cuando las plantas se mantienen en condiciones de día corto después de la infiltración.

Plantas e infiltraciones. Las plantas PM132 de *N.tabacum* se cultivan a una densidad de 75 plantas por m cuadrado. Las plantas de 42 días de edad se infiltran con una mezcla de dos cepas AGL1 de *A.tumefaciens* que contienen pC91 (vector de expresión binario de tGFP) y pC120 (vector de expresión binario del supresor del silenciamiento génico HcPro) en una relación 1:1 y DO_{600} final=0,32. Las plantas tienen una altura promedio de 43,4 cm y tienen una conductancia estomática promedio de $559,6 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lo que indica una apertura estomática adecuada para la absorción del inóculo (Tabla 5). Después de la infiltración, las plantas se incuban en dos ciclos de luz diferentes: 8 horas de luz por día o 20 horas de luz por día. La mitad de las plantas en cada tratamiento de luz se colocan en posición vertical hacia arriba normal y la otra mitad en una posición invertida. En total, se realizan 4 tratamientos. Las plantas se cosechan a los 0, 3, 5, 7 y 9 días después de la infiltración. Para cada medición, se cosechan 4 plantas por tratamiento y se toman 3 discos de hojas por planta para el análisis de expresión de tGFP. Para la cuantificación de tGFP, los discos de hojas se muelen en 1 ml de tampón GFP y se mezclan 5 μ l del extracto con 200 μ l de tampón GFP para las mediciones de fluorescencia según se describió antes.

Resultados. La cuantificación de la expresión de tGFP (mg de tGFP/kg de peso fresco de biomasa) en los dos regímenes de luz después de la infiltración reveló efectos significativos de la luz sobre la producción de proteína recombinante (Figura 8). Independientemente de la posición de la planta (vertical hacia arriba o invertida), las plantas incubadas en condiciones de días cortos produjeron cantidades de tGFP significativamente mayores como puede observarse en la Figura 8. En el día 7 después de la infiltración, en las plantas incubadas con 8 horas de luz, la expresión de tGFP es dos veces la cantidad en comparación con las plantas incubadas bajo 20 horas de luz después de la infiltración.

En el día 7 después de la infiltración, la expresión de tGFP en las plantas en posición vertical hacia arriba bajo 8 horas es 104 % mayor que la expresión de tGFP en plantas similares incubadas bajo un régimen de 20 horas de luz. Para las plantas incubadas hacia abajo, la tendencia es similar a las plantas bajo 8 horas de luz que producen 50 % más tGFP que las plantas incubadas bajo un régimen de 20 horas de luz. La incubación en una posición invertida mejoró además la expresión de tGFP en las plantas cultivadas bajo los dos regímenes de luz (8 horas de luz y 20 horas de luz). El aumento de la expresión es más pronunciado con el tratamiento de 20 horas de luz en comparación con 8 horas de luz y podría aumentar de 371,2 mg de tGFP/kg de peso fresco de biomasa para las plantas cultivadas en posición vertical hacia arriba normal y 20 horas de luz, a 857,5 mg de tGFP/kg de peso fresco de biomasa para las plantas incubadas en posición hacia abajo con 8 horas de luz, que representa un aumento de 130 % en el rendimiento de proteína recombinante.

Ejemplo 16. Infiltración optimizada de las plantas por *Agrobacterium*

Este ejemplo describe el resultado de un experimento en donde se investiga la apertura estomática de las plantas de tabaco antes de la infiltración. Los resultados indican que antes de la infiltración, las plantas de tabaco deben exponerse a la luz de manera que la conductancia estomática esté en un intervalo que sea característico de la planta de tabaco cultivada en condiciones de buena iluminación. Las plantas de tabaco se cultivaron a una densidad de aproximadamente 9 plantas/m² para evitar cualquier competencia por la luz o el espacio. Las unidades experimentales se controlaron diariamente para asegurar un ambiente de siembra uniforme y estable. La solución de irrigación tenía un valor de conductividad eléctrica (E.C) de 2,4 y un contenido de nitrógeno igual a 206 mg/l para asegurar el suministro de nutrientes adecuado. El régimen de riego se ajustó de acuerdo con las necesidades de las plantas para evitar cualquier estrés provocado por exceso o defecto del riego.

Dos variedades, PM132 y PM15, de plantas de *N.tabacum* a los 39 días de edad se transformaron con *Agrobacterium* (Agl1) que contiene un casete de expresión que codifica TurboGFP (pC91) en combinación con *Agrobacterium* (Agl1) que expresa Hc-Pro según se describió anteriormente. La expresión de la GFP estuvo dirigida por un promotor mínimo de CaMV35S más y una 5' UTR del virus del mosaico del caupí (HT-CPMV) mientras que la expresión de Hc-Pro estuvo dirigida por un promotor doble de 35S de CaMV. Las concentraciones bacterianas en la mezcla de infiltración se mantuvieron en 0,16 para un tratamiento con una sola construcción (GFP o Supresor del Silenciamiento (SoS)) y 0,32 para los tratamientos con dos construcciones (GFP+SoS). Las plantas se infiltraron a 50 mbar durante 1 min según los protocolos de infiltración estándar.

Antes de las infiltraciones la mitad de las plantas se colocó en un compartimento oscuro mientras que la otra mitad se colocó dentro de un compartimento con luz natural suplementado con luz artificial. Durante este tiempo, se registró la conductancia estomática mediante el uso de un porómetro de estado constante SC-1 (Decagon Devices, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron en tres hojas consecutivas totalmente expandidas en las posiciones 4, 5 y 6 (donde 1 es la primera hoja en el brote apical que es perpendicular al tallo). El contenido de agua del sustrato de siembra (lana de roca) se midió con un sensor WET-2 (Delta-T devices, Estados Unidos).

Las diferencias en la conductancia estomática fueron muy significativas entre los tratamientos de luz y oscuridad para ambas variedades de tabaco. Las plantas mantenidas a la luz mostraron valores de conductancia entre 4 y 8

veces mayores que las plantas mantenidas en la oscuridad: Las plantas PM132 en la luz mostraron un valor promedio de $260,6 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mientras en oscuridad de $70,4 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Similarmente, las plantas PM15 a la luz mostraron un valor promedio de $440,1 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mientras en la oscuridad de $53,6 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Estos resultados indican que la apertura estomática en el tabaco puede regularse por la cantidad de luz proporcionada a las plantas: el mantenimiento de las plantas en condiciones de buena iluminación promueve la apertura estomática, la disminución de la cantidad de luz reduce significativamente la apertura estomática (menor conductancia estomática). Además vale la pena señalar que también se observan diferencias en la conductancia estomática entre las variedades de tabaco, donde PM15 exhibe 1,7 veces mayor conductancia en condiciones de luz que PM132. En consecuencia, se prefiere que antes de la infiltración, la conductancia estomática de PM132 esté en un intervalo que sea mayor que aproximadamente $70 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mayor que $100 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mayor que $150 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mayor que $200 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mayor que $250 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o mayor que $300 \mu \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Las hojas infiltradas se congelaron y se molieron hasta obtener un polvo en hielo seco. Se extrajo la GFP y se midió la fluorescencia. Para ambas variedades de tabaco, el contenido de GFP fue significativamente mayor para las plantas incubadas a la luz que las plantas incubadas en la oscuridad. En PM132 las plantas incubadas a la luz mostraron un 40 % más de fluorescencia que las plantas incubadas en la oscuridad. Para PM15 las plantas incubadas a la luz mostraron un 200 % más de fluorescencia que las plantas incubadas en la oscuridad.

Los datos mostraron que los estomas en el tabaco responden rápidamente a los cambios en las condiciones de luz. Las plantas colocadas con luz baja mostraron entre 4 y 8 veces menos conductancia estomática que las plantas con buena iluminación. El cierre de los estomas provocado por la luz baja tiene un impacto negativo sobre la eficacia de la infiltración al vacío y por lo tanto reduce la expresión de GFP en tabaco. Las plantas incubadas en la oscuridad muestran grandes áreas de tejido foliar no infiltrado y una reducción de la expresión de GFP de más del 50 %, en comparación con las plantas cultivadas en condiciones de luz normales.

Ejemplo 17. Infiltración de plantas de tabaco con enzimas

Este ejemplo describe el resultado de un experimento en donde las plantas de tabaco previamente infiltradas con *Agrobacterium* se tratan con enzimas que degradan o digieren la pared de la célula vegetal para ayudar a la extracción y aislamiento de la proteína heteróloga. Las plantas de tabaco se han infiltrado por la construcción genética pC71 que comprende una secuencia codificante para H5 según se describió anteriormente, y se incuban en condiciones de invernadero que permiten la expresión transitoria y la producción de H5. Se preparó una mezcla acuosa de enzimas: 0,05 % de Macerozyme, 0,4 % de celulosa, 0,066 % de Driselase, manitol 0,6 M, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) a 0,7 g/l a pH 5,6. En una muestra de la mezcla enzimática, se añade glicina a una concentración de 15 g/l.

La mezcla enzimática se inyecta en la parte inferior de las hojas de tabaco mediante una jeringa a un volumen de 0,3 ml por gramo de hoja. Para la comparación, tiras de hojas cortadas de manera delgada se sumergieron y se incubaron en la misma mezcla. Las hojas se incubaron durante 12 horas antes de la cosecha y extracción de H5. La transferencia Western con anticuerpo anti-H5 mostró que se obtuvieron cantidades similares de H5 con las mezclas enzimáticas con o sin glicina. La eficacia de extracción por infiltración con jeringa y por inmersión de las hojas cortadas también fue similar. Los resultados muestran que la infiltración de hojas de tabaco con enzimas que digieren la pared celular puede usarse para ayudar a la extracción de la proteína heteróloga a partir de las plantas de tabaco.

Tablas

Tabla 1.

Especie	Variedad
N. tabacum	AA 37-1
N. tabacum	B 13P
N. tabacum	Xanthi (Mitchell-Mor)
N. tabacum	Bel-W3
N. tabacum	Samsun Holmes NN
N. tabacum	F4 del cruce BU21 x Hoja Parado, línea 97
N. tabacum	Burley 21
N. tabacum	PM016
N. tabacum	PM021
N. tabacum	K 149
N. tabacum	K 326
N. tabacum	K 346
N. tabacum	K 358
N. tabacum	K 394
N. tabacum	K 399
N. tabacum	K 730
N. tabacum	KY 10

ES 2 637 825 T3

	N. tabacum	KY 14
	N. tabacum	KY 160
	N. tabacum	KY 17
	N. tabacum	KY 8959
5	N. tabacum	KY 9
	N. tabacum	KY 907
	N. tabacum	MD 609
	N. tabacum	McNair 373 (MN 373)
10	N. tabacum	NC 2000
	N. tabacum	PG 01
	N. tabacum	PG 04
	N. tabacum	PO1
15	N. tabacum	PO2
	N. tabacum	PO3
	N. tabacum	RG 11
	N. tabacum	RG 17
20	N. tabacum	RG 8
	N. tabacum	Speight G-28
	N. tabacum	TN 86
	N. tabacum	TN 90
25	N. tabacum	VA 509
	N. tabacum	AS44
	N. tabacum	Banket A1
	N. tabacum	Basma Drama B84/31
30	N. tabacum	Basma I Zichna ZP4/B
	N. tabacum	Basma Xanthi BX 2A
	N. tabacum	Batek
35	N. tabacum	Besuki Jember
	N. tabacum	C104
	N. tabacum	Coker 319
	N. tabacum	Coker 347
40	N. tabacum	Criollo Misionero
	N. tabacum	PM092
	N. tabacum	Delcrest
	N. tabacum	Djebel 81
45	N. tabacum	DVH 405
	N. tabacum	Galpão Comum
	N. tabacum	HB04P
	N. tabacum	HICKS
50	N. tabacum	Kabakulak Ellassona
	N. tabacum	PM102
	N. tabacum	Kutsaga 51E
	N. tabacum	Kutsaga E1
55	N. tabacum	KY 14xL8
	N. tabacum	KY 171
	N. tabacum	LA BU 21
	N. tabacum	McNair 944 (MN 944)
60	N. tabacum	NC 2326
	N. tabacum	NC 71
	N. tabacum	NC 297
65	N. tabacum	NC 3

ES 2 637 825 T3

	N. tabacum	PVH 03
	N. tabacum	PVH 09
	N. tabacum	PVH 19
	N. tabacum	PVH 2110
5	N. tabacum	Red Russian
	N. tabacum	Samsun
	N. tabacum	Saplak
	N. tabacum	Simmaba
10	N. tabacum	Talgar 28
	N. tabacum	PM132
	N. tabacum	Wisliça
	N. tabacum	Yayaldag
15	N. tabacum	NC 4
	N. tabacum	TR Madole
	N. tabacum	Prilep HC-72
	N. tabacum	Prilep P23
20	N. tabacum	Prilep PB 156/1
	N. tabacum	Prilep P12-2/1
	N. tabacum	Yaka JK-48
	N. tabacum	Yaka JB 125/3
25	N. tabacum	TI-1068
	N. tabacum	KDH-960
	N. tabacum	TI-1070
	N. tabacum	TW136
30	N. tabacum	PM204
	N. tabacum	PM205
	N. tabacum	Basma
	N. tabacum	TKF 4028
35	N. tabacum	L8
	N. tabacum	TKF 2002
	N. tabacum	TN90 (GR141)
	N. tabacum	Basma xanthi
40	N. tabacum	GR149
	N. tabacum	GR153
	N. tabacum	Petit Havana
45	N. tabacum	PM215
	N. tabacum	PM216
	N. tabacum	PM217
	N. tabacum	Denizli
50	N. tabacum	Izmir
	N. tabacum	Coker 371 Gold
	N. tabacum	Dac Mata Fina
	N. tabacum	BY-64
55	N. tabacum	Kasturi Mawar
	N. tabacum	Karabalgar
	N. tabacum	Xanthi NN
	N. tabacum	Samsun NN
60	N. tabacum	Turkish Samsun

Tabla 2.

5	Acceso	Expresión en 3 plantas	Fenotipo de hojas infiltradas	Fenotipo de planta control
	PM092	+++ , +++ , +++	verde a verde claro	verde
	PO2	+++ , +++ , +++	verde	verde
10	PM016	+++ , +++ , +++	amarillento	verde claro
	AS44	+++ , +++ , +++	verde claro - amarillento	verde
	RG17	+++ , +++ , +++	amarillento	verde
	RG8	+++ , +++ , +++	verde claro - amarillento	verde
	BY-64	+++ , +++ , +++	amarillento	verde claro
	Coker 371 Gold	++/+++ , ++ , ++/+++	verde claro - amarillento	verde
	HB04P	+++ , +++ , +++	amarillento	verde
	Basma Xanthi BX 2A	+++ , +++ , +++	verde claro - amarillento	verde
	Coker 319	+++ , +++ , +++	verde claro - amarillento	verde
	Hicks	+++ , +++ , +++	verde claro - amarillento	verde
	Dac Mata Fina	+++ , +++ , +++	verde a verde claro	verde
	McNair 944 (MN 944)	+++ , +++ , +++	verde claro	verde
	Burley 21	+++ , ++ , +++	amarillento	verde claro
	K149	+++ , ++ , +++	verde claro - amarillento	verde claro
	Yaka JB 125/3	+++ , ++ , +++	verde	verde
	PM102	+++ , ++ , +++	verde a amarillento	verde
	NC 297	++/+++ , ++/+++ , ++/+++	verde claro - amarillento	verde
	PM021	++/+++ , ++ , ++/+++	verde claro - amarillento	verde
	PO2	++/+++ , ++ , ++/+++	verde	verde
	Kasturi Mawar	+++ , ++ , +++	verde a amarillento	verde
	Wislica	++/+++ , ++/+++ , ++	verde claro	verde
	Simmaba	++ , ++ , ++/+++	verde claro	verde
	PM132	++ , ++ , ++	verde claro	verde
	AA37-1	++ , ++ , ++	amarillento	verde, hojas del fondo amarillas
	Turkish Samsun	++ , ++ , ++	verde claro	verde
	B13P	++ , ++ , ++	amarillento	verde
	F4 del cruce BU21 x Hoja Parado, línea 97	++ , ++ , ++	amarillento	verde claro
	PM204	++ , ++ , ++	verde a verde claro	verde
	PO1	++ , ++ , ++	verde claro	verde
	Samsun NN	++ , ++ , ++	verde a verde claro	verde

Tabla 3.

Características de la biomasa

Altura de la planta (cm)		Conductancia estomática ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Contenido de clorofila L4		Grosor de la hoja (mm)		Contenido de agua (%)		
Densidad	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
PM132										
25	32,9	0,6	956,6	78,1	28,63	1,4	0,290	0,005	62,3	1,4
100	51,5	0,9	985,1	204,3	18,32	1,8	0,230	0,005	61,69	0,7
PM217										
25	40,1	1,0	817,7	123,1	41,53	1,8	0,249	0,006	36,07	1,3
100	50,7	1,3	824,7	159,0	28,19	1,3	0,211	0,005	60,69	0,6

Tabla 4.

Concentración de GFP y H5 en mg/kg de peso fresco de hojas

GFP	Hacia arriba		Hacia abajo		Hacia arriba		Hacia abajo	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
PM132								
25	343,4	15,5	482,4	19,0	19,5	5,4	33,4	2,4
100	483,0	63,9	499,8	60,1	27,1	2,8	29,0	3,8
PM217								
25	314,8	29,3	441,8	10,7	20,5	3,4	28,9	1,2
100	449,4	36,5	439,7	25,7	24,8	1,0	29,9	1,2

Tabla 5.

Características de las plantas

	Altura (cm)		Conductancia estomática ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Contenido de clorofila L4		Grosor de la hoja (mm)		Contenido de agua (%)	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
8 y 20 horas	43,4	1,52	559,6	92,87	27,37	1,71	0,253	0,005	60,3	1,16
8, 14 y 20 horas	41,5	1,6	250,1	53,0	16,7	0,9	0,243	0,010	67,0	0,5

Depósito:

- 5 El 6 de enero de 2011 se depositaron las siguientes muestras de semillas en NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, UK bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en nombre de Philip Morris Products S.A:

10 Hasta la concesión de una patente o durante 20 años a partir de la fecha de presentación si la solicitud es rechazada o retirada, sólo se expedirá una muestra a un experto independiente designado por el solicitante (Regla 13bis.6 PCT).

	PM designación de la línea de semillas	Fecha de depósito	Núm. de registro
15	PM016	6 de enero de 2011	NCIMB 41798
	PM021	6 de enero de 2011	NCIMB 41799
	PM092	6 de enero de 2011	NCIMB 41800
20	PM102	6 de enero de 2011	NCIMB 41801
	PM132	6 de enero de 2011	NCIMB 41802
	PM204	6 de enero de 2011	NCIMB 41803
25	PM205	6 de enero de 2011	NCIMB 41804
	PM215	6 de enero de 2011	NCIMB 41805
	PM216	6 de enero de 2011	NCIMB 41806
30	PM217	6 de enero de 2011	NCIMB 41807

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Philipp Morris Products S.A.
 35 <120> Expresión de proteínas en plantas
 <130> S2195 PCT BS
 40 <150> EP 11 15 1190.3
 <151> 2011-01-17
 <160> 21
 45 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 5139
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: vector pPMP1"
 55 <400> 1
 ctactagtcc cctagtacat taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc 60
 60 aatttggttta caccacaata tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag 120

ES 2 637 825 T3

	ctcggcaciaa aatcaccact cgatacaggc agcccatcag gccttgacgg ccttccttca	180
	attcgcccta tagtgagtcg tattacgtcg cgctcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt	240
5	gactgggaaa accctggcgt taccacaactt aatcgccctg cagcacatcc ccctttcgcc	300
	agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gaaacgccct tcccaacagt tgcgcagcct	360
10	gaatggcgaa tgggagcgcc ctgtagcggc cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg	420
	at ttataaagg gattttgccc atttcggcct attgggttaaa aaatgagctg atttaacaaa	480
	aat ttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg	540
15	aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct	600
	catgagaciaa taaccctgat aaatgcttca ataataattga aaaaggaaga gtatgattga	660
20	acaggatggc ctgcatgcgg gtagcccgcc agcgtgggtg gaacgtctgt ttggctatga	720
	ttggggcgag cagaccattg gctgctctga tgcggcggtg tttcgtctga gcgcgcaggg	780
	tcgtccggtg ctgtttgtga aaaccgatct gagcgggtgcg ctgaacgagc tgcaggatga	840
25	agcggcgcgct ctgagctggc tggccaccac cgggtgttccg tgtgcggcggtg tgctggatgt	900
	ggtgaccgaa gcggggcgtg attggctgct gctgggcgaa gtgccgggtc aggatctgct	960
30	gtctagccat ctggcgccgg cagaaaaagt gagcattatg gcggatgcca tgcgtcgtct	1020
	gcataccctg gaccggcgga cctgtccgtt tgatcatcag gcgaaacatc gtattgaacg	1080
	tgcgcgtacc cgtatggaag cgggcctggt ggatcaggat gatctggatg aagaacatca	1140
35	gggcctggca ccggcagagc tgtttgcgcg tctgaaagcg agcatgccgg atggcgaaga	1200
	tctggtggtg acccatggtg atgcgtgcct gccgaacatt atggtggaaa atggccgttt	1260
40	tagcggcttt attgattgcg gccgtctggg cgtggcggtg cgttatcagg atattgcgt	1320
	ggccaccctg gatattgcgg aagaactggg cggcgaatgg gcggatcggt ttctggtgct	1380
	gtatggcatt gcggcaccgg atagccagcg tattgcgttt tatcgtctgc tggatgaatt	1440
45	tttctaataa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca	1500
	tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc	1560
50	ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc	1620
	ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc	1680
	agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt	1740
55	cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt	1800
	caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	1860

ES 2 637 825 T3

	tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	1920
5	ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac	1980
	ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg	2040
	gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg caggggtcggg acaggagagc gcacgagggg	2100
10	gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact	2160
	tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa acgccagcaa	2220
15	cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcattagg caccacaggc	2280
	tttaccggaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggagag cgcccaatac	2340
	gcaaggaaac agctatgacc atgttaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa	2400
20	gcgggcagtg aaaggaaggc ccatgaggcc agttaattaa cgatcgagta ctaaagccca	2460
	gtaaagcgct ggctgctgaa cccccagccg gaactgaccc cacaaggccc tagcgtttgc	2520
25	aatgcaccag gtcattcattg acccaggcgt gttccaccag gccgctgcct cgcaactctt	2580
	cgcaggcttc gccgacctgc tcgcgccact tcttcacgcg ggtggaatcc gatccgcaca	2640
	tgaggcggaa ggtttccagc ttgagcgggt acggctcccg gtgcgagctg aaatagtcga	2700
30	acatccgtcg ggccgtcggc gacagcttgc ggtacttctc ccatatgaat ttcgtgtagt	2760
	ggtcgccagc aaacagcacg acgatttcct cgtcgatcag gacctggcaa cgggacgttt	2820
35	tcttgccacg gtccaggacg cggaagcggg gcagcagcga caccgattcc aggtgcccaa	2880
	cgcggtcgga cgtgaagccc atcgccgtcg cctgtaggag cgacaggcat tcctcggcct	2940
	tcgtgtaata ccggccattg atcgaccagc ccaggctcctg gcaaagctcg tagaacgtga	3000
40	aggtgatcgg ctgcgccgata ggggtgcgct tcgcgtactc caacacctgc tgccacacca	3060
	gttcgtcatc gtcggcccgc agctcgacgc cgggtgtaggt gatcttcacg tccttggtga	3120
45	cgtggaaaat gaccttgttt tgcagcgcct cgcgcgggat tttcttggtg cgcgtggtga	3180
	acagggcaga gcgggcccgtg tcgtttggca tcgctcgcat cgtgtccggc cacggcgcaa	3240
	tatcgaacaa ggaaagctgc atttccttga tctgctgctt cgtgtgtttc agcaacgcgg	3300
50	cctgcttggc ctgcgtgacc tgttttgcca ggtcctcgcc ggcggttttt cgcttcttgg	3360
	tcgtcatagt tcctcgcgtg tcgatgggtc tcgacttcgc caaacctgcc gcctcctgtt	3420
55	cgagacgacg cgaacgctcc acggcggccg atggcgcggg cagggcaggg ggagccagtt	3480
	gcacgctgtc gcgctcgatc ttggccgtag cttgctggac catcgagccg acggactgga	3540

ES 2 637 825 T3

	aggttttcgcg	gggcgcacgc	atgacggtgc	ggcttgcgat	ggtttcggca	tcctcggcgg	3600
	aaaacccccgc	gtcgatcagt	tcttgctgt	atgccttccg	gtcaaacgtc	cgattcattc	3660
5	accctccttg	cgggattgcc	ccgactcacg	ccggggcaat	gtgcccttat	tcctgatttg	3720
	acccgccttg	tgccttggtg	tccagataat	ccaccttata	ggcaatgaag	tcggtcccgt	3780
	agaccgtctg	gccgtccttc	tcgtacttgg	tattccgaat	cttgccctgc	acgaatacca	3840
10	gcgacccctt	gcccaaatac	ttgccgtggg	cctcggcctg	agagccaaaa	cacttgatgc	3900
	ggaagaagtc	ggtgcgctcc	tgcttgtcgc	cggcatcggt	gcgccacata	tcgattatga	3960
15	tagaattttac	aagctataag	gttattgtcc	tgggtttcaa	gcattagtcc	atgcaagttt	4020
	ttatgctttg	cccattctat	agatatattg	ataagcgcg	tgcttatgcc	ttgccccctg	4080
	aaatccttac	atacggcgat	atcttctata	taaaagatat	attatcttat	cagtattgtc	4140
20	aatatattca	aggcaatctg	cctcctcatc	ctcttcatcc	tcttcgtctt	ggtagctttt	4200
	taaatatggc	gcttcataga	gtaattctgt	aaaggtccaa	ttctcgtttt	catacctcgg	4260
25	tataatctta	cctatcacct	caaatggttc	gctgggttta	tcgcccggga	gggttcgaga	4320
	aggggggggca	cccccttcg	gcgtgcgcgg	tcacgcgcac	agggcgcgag	cctgggttaa	4380
	aacaagggtt	ataaatattg	gtttaaaagc	aggttaaaag	acagggttagc	ggtagccgaa	4440
30	aaacgggcgg	aaacccttgc	aatgctgga	ttttctgcct	gtggacagcc	cctcaaattg	4500
	caatagggtg	gcccctcatc	tgctcagcact	ctgcccctca	agtgtcaagg	atcgcgcccc	4560
35	tcattctgtca	gtagtcgcgc	ccctcaagtg	tcaataccgc	agggcactta	tcccagggt	4620
	tgtccacatc	atctgtggga	aactcgcgta	aatcaggcg	ttttcgccga	tttgcgaggc	4680
	tggccagctc	cacgtcgccg	gccgaaatcg	agcctgcccc	tcattctgtca	acgccgcgcc	4740
40	gggtgagtcg	gcccctcaag	tgtcaacgtc	cgcccctcat	ctgtcagtga	gggccaagtt	4800
	ttccgcgagg	tatccacaac	gccggcgggc	gcggtgtctc	gcacacgggt	tcgacggcgt	4860
45	ttctggcgcg	tttgcagggc	catagacggc	cgccagccca	gcggcgaggg	caaccagccc	4920
	ggtgagcgtc	gcaaaggcgc	tcggtcttgg	cgcgccaacc	ctgtggttgg	catgcacata	4980
	caaattggacg	aacggataaa	ccttttcacg	cccttttaaa	tatccgatta	ttctaataaa	5040
50	cgctcttttc	tcttaggttt	acccgccaat	atatcctgtc	aaacactgat	agtttaaact	5100
	gaaggcgggga	aacgacaatc	tgcttgcagg	aattgaatt			5139
55							
	<210> 2						
	<211> 314						

ES 2 637 825 T3

```

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
  <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: promotor mínimo de
    35S-CaMV"

<400> 2
10 gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgagaag atagtggaaa      60
   aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg      120
15 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag      180
   aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa      240
   gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat      300
20 ttcatttgga gagg                                                    314

<210> 3
25 <211> 516
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

<220>
30 <221> fuente
   <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: 5'-UTR HT-CPMV"

<400> 3
35 tattaaaatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaaccttc      60
   ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgcgtgagc      120
   gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc      180
40 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc      240
   ctattcttgt cgggtgtggtc tgggaaaaga aagcttgctg gaggctgctg ttcagcccca      300
   tacattactt gttacgattc tgctgacttt cggcgggtgc aatatctcta cttctgcttg      360
   acgaggtatt gttgcctgta cttctttctt cttcttcttg ctgattgggt ctataagaaa      420
   tctagtatth tctttgaaac agagttttcc cgtgggtttc gaacttgag aaagattggt      480
50 aagcttctgt atattctgcc caaatttgtc gggccc                                516

<210> 4
55 <211> 188
   <212> ADN
   <213> secuencia artificial

```

ES 2 637 825 T3

```

<220>
<221>  fuente
<223>  /nota="Descripción de secuencia artificial: 3'-UTR HT-CPMV"
5
<400>  4

attttcttta gtttgaattt actgttattc ggtgtgcatt tctatgtttg gtgagcggtt      60
10  ttctgtgctc agagtgtggt tattttatgt aatttaattt ctttgtgagc tcctgttttag      120
    caggtcgtcc cttcagcaag gacacaaaaa gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa      180
    agaccggg                                     188
15

<210>  5
<211>  2781
<212>  ADN
20 <213>  secuencia artificial

<220>
<221>  fuente
<223>  /nota="Descripción de secuencia artificial: P1-HcPro-P3"
25
<400>  5

atggcactca tctttggcac agtcaacgct aacatcctga aggaagtgtt cgggtggagct      60
30  cgtatggctt gcgttaccag cgcacatatg gctggagcga atggaagcat tttgaagaag      120
    gcagaagaga cctctcgtgc aatcatgcac aaaccagtga tcttcggaga agactacatt      180
    accgaggcag acttgcctta cacaccactc catttagagg tcgatgctga aatggagcgg      240
35  atgtattatc ttggtcgtcg cgcgctcacc catggcaaga gacgcaaagt ttctgtgaat      300
    aacaagagga acaggagaag gaaagtggcc aaaacgtacg tggggcgtga ttccattgtt      360
    gagaagattg tagtgcccca caccgagaga aaggttgata ccacagcagc agtgaagac      420
    atttgcaatg aagctaccac tcaacttggt cataatagta tgccaaagcg taagaagcag      480
    aaaaacttct tgcccggcac ttcactaagt aacgtgtatg ccaaacttg gagcatagtg      540
45  cgcaaacgcc atatgcaggt ggagatcatt agcaagaaga gcgtccgagc gaggggtcaag      600
    agatttgagg gctcggtgca attgttcgca agtgtgcgtc acatgtatgg cgagaggaaa      660
    aggggtggact tacgtattga caactggcag caagagacac ttctagacct tgctaaaaga      720
    ttttaagaatg agagagtgga tcaatcgaag ctacttttg gttcaagtgg cctagttttg      780
    aggcaaggct cgtacggacc tgcgcattgg tatcgacatg gtatgttcat tgtacgcggt      840
55  cggtcggatg ggatgttggt ggatgctcgt gcgaaggtaa cgttcgtgtt ttgtcactca      900

```

ES 2 637 825 T3

	atgacacatt atagcgacca tcaccatcac catcacgcgt ccgacaaatc aatctctgag	960
	gcattcttca taccatactc taagaaattc ttggagttga gaccagatgg aatctcccat	1020
5	gagtgtacaa gaggagtatc agttgagcgg tgcggtgagg tggctgcaat cctgacacaa	1080
	gcactttcac cgtgtggtaa gatcacatgc aaacgttgca tggttgaaac acctgacatt	1140
10	gttgaggggtg agtcgggagg aagtgtcacc aaccaaggta agctcctagc aatgctgaaa	1200
	gaacagtatc cagattttccc aatggccgag aaactactca caaggttttt gcaacagaaa	1260
	tcactagtaa atacaaattt gacagcctgc gtgagcgtca aacaactcat tggtgaccgc	1320
15	aaacaagctc cattcacaca cgtactggct gtcagcgaaa ttctgtttta aggcaataaa	1380
	ctaacagggg ccgatctcga agaggcaagc acacatatgc ttgaaatagc aaggttcttg	1440
20	aacaatcgca ctgaaaatat gcgcattggc caccttgggt ctttcagaaa taaaatctca	1500
	tcgaaggccc atgtgaataa cgcactcatg tgtgataatc aacttgatca gaatgggaat	1560
	tttattttggg gactaagggg tgcacacgca aagaggtttc ttaaaggatt tttcactgag	1620
25	attgacccaa atgaaggata cgataagtat gttatcagga aacatatcag gggtagcaga	1680
	aagctagcaa ttggcaattt gataatgtca actgacttcc agacgctcag gcaacaaatt	1740
30	caaggcgaaa ctattgagcg taaagaaatt gggaatcact gcatttcaat gcggaatggt	1800
	aattacgtgt acccatgttg ttgtgttact cttgaagatg gtaaggctca atattcggat	1860
	ctaaagcatc caacgaagag acatctggtc attggcaact ctggcgattc aaagtaccta	1920
35	gaccttccag ttctcaatga agagaaaatg tatatagcta atgaaggtta ttgctacatg	1980
	aacattttct ttgctctact agtgaatgtc aaggaagagg atgcaaagga cttcaccaag	2040
40	tttataaggg acacaattgt tccaaagctt ggagcgtggc caacaatgca agatgttgca	2100
	actgcatgct acttactttc cattctttac ccagatgtcc tgagtgctga attaccaga	2160
	attttggttg atcatgacaa caaaacaatg catgttttgg attcgtatgg gtctagaacg	2220
45	acaggatacc acatgttgaa aatgaacaca acatcccagc taattgaatt cgttcattca	2280
	ggtttggaat ccgaaatgaa aacttacaat gttggaggga tgaaccgaga tatggtcaca	2340
50	caaggtgcaa ttgagatggt gatcaagtcc atatacaaac cacatctcat gaagcagtta	2400
	cttgaggagg agccatacat aattgtcctg gcaatagtct ccccttcaat ttttaattgcc	2460
	atgtacaact ctggaacttt tgagcaggcg ttacaaatgt ggttgccaaa tacaatgagg	2520
55	ttagctaacc tcgctgccat cttgtcagcc ttggcgcaaa agttaacttt ggcagacttg	2580
	ttcgtccagc agcgtaattt gattaatgag tatgcgcagg taattttgga caatctgatt	2640

ES 2 637 825 T3

gacggtgtca gggttaacca ttcgctatcc ctagcaatgg aaattgttac tattaagctg 2700

gccacccaag agatggacat ggcgttgagg gaaggtggct atgctgtgac ctctgcagat 2760

5 cgttcaaaca tttggcaata a 2781

<210> 6

10 <211> 25

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: iniciador directo PC201F"

<400> 6

20 agaaggcctt ccgggacggc gtcag 25

<210> 7

<211> 23

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: iniciador inverso PC201F"

<400> 7

35 atggcgcgcc cccctcgga tca 23

<210> 8

<211> 1707

<212> ADN

40 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: HEI optimizado maduro (H5) "

<400> 8

atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaata gtcagtcttg ttaaaagtga tcagatttgc 60

50 attggttacc atgcaaaca ttcaacagag cagggttgaca caatcatgga aaagaacgtt 120

actgttacac atgcccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180

55 gatggagtga agcctctaatt tttaagagat tgtagtgtag ctggatggct cctcgggaac 240

ccaatgtgtg acgaattcat caatgtaccg gaatggtctt acatagtgga gaaggccaat 300

ES 2 637 825 T3

	ccaaccaatg acctctgtta cccagggagt ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta	360
5	ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt caaatcatcc ccaaaagttc ttggtccgat	420
	catgaagcct catcaggagt tagctcagca tgtccatacc tgggaagtcc ctccctttttt	480
	agaaatgttg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaaaagctac	540
10	aataatacca accaagagga tcttttggta ctgtggggaa ttcaccatcc taatgatgcy	600
	gcagagcaga caaggctata tcaaaaccca accacctata tttccattgg gacatcaaca	660
15	ctaaaccaga gattgggtacc aaaaatagct actagatcca aagtaaacyg gcaaagtgga	720
	aggatggagt tcttctggac aatttttaaaa cctaattgatg caatcaactt cgagagtaat	780
	ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt	840
20	atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaactcc aatggggggcg	900
	ataaactcta gtatgccatt ccacaacata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa	960
25	tatgtgaaat caaacagatt agtccttgca acagggctca gaaatagccc tcaaagagag	1020
	agcagaagaa aaaagagagg actatttggga gctatagcag gttttataga gggaggatgg	1080
	cagggaatgg tagatggttg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac	1140
30	gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactca	1200
	atcattgaca aaatgaacac tcagtttgag gccgttggaa gggaatttaa taacttagaa	1260
35	aggagaatag agaattttaa caagaagatg gaagacgggt ttctagatgt ctggacttat	1320
	aatgccgaac ttctggttct catggaaaat gagagaactc tagactttca tgactcaa	1380
	gttaagaacc tctacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt	1440
40	aacggttggt tcgagttcta tcacaaatgt gataatgaat gtatggaaag tataagaa	1500
	ggaacgtaca actatccgca gtattcagaa gaagcaagat taaaagaga ggaaataagt	1560
45	ggggtaaaat tggaatcaat aggaacttac caaatactgt caatttatc aacagtggcg	1620
	agttccctag cactggcaat catgatggct ggtctatctt tatggatgtg ctccaatgga	1680
	tcgttacaat gcagaatttg catttaa	1707
50	<210> 9 <211> 378 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente	

ES 2 637 825 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pMMV único mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

<400> 9

```

5      gaattcgtca acttcgtcca cagacatcaa catcttatcg tcctttgaag ataagataat      60
      aatggttgaag ataagagtgg gagccaccac taaaacattg ctttgtcaaa agctaaaaaa      120
10     gatgatgccc gacagccact tgttgtgaagc atgagaagcc ggtccctcca ctaagaaaat      180
      tagtgaagca tcttccagtg gtccctccac tcacagctca atcagtgagc aacaggacga      240
      aggaaatgac gtaagccatg acgtctaata ccacaagaat ttccttatat aaggaacaca      300
15     aatcagaagg aagagatcaa tcgaaatcaa aatcggaatc gaaatcaaaa tcggaatcga      360
      aatctctcat ctaagctt                                     378

```

20

```

<210> 10
<211> 641
<212> ADN
<213> secuencia artificial

```

25

```

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pMMV doble mejorado entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

```

30

```

<400> 10

      gaattcgtca acttcgtcca cagacatcaa catcttatcg tcctttgaag ataagataat      60
35     aatggttgaag ataagagtgg gagcccccac taaaacattg ctttgtcaaa agctaaaaaa      120
      gatgatgccc gacagccact tgttgtgaagc atgagaagcc ggtccctcca ctaagaaaat      180
      tagtgaagca tcttccagtg gtccctccac tcacagctca atcagtgagc aacaggacga      240
40     aggaaatgac gtaagccatg acgtctaata ccaacttcgt ccacagacat caacatctta      300
      tcgtcctttg aagataagat aataatgttg aagataagag tgggagccac cactaaaaca      360
      ttgctttgtc aaaagctaaa aaagatgatg cccgacagcc acttgtgtga agcatgagaa      420
      gccggtccct ccactaagaa aattagttaa gcatcttcca gtgggtccct cactcacagc      480
      tcaatcagtg agcaacagga cgaaggaaat gacgtaagcc atgacgtcta atcccacaag      540
50     aatttcctta tataaggaac acaaatcaga aggaagagat caatcgaaat caaaatcgga      600
      atcgaaatca aaatcggaat cgaaatctct catctaagct t                                     641

```

55

```

<210> 11
<211> 348

```

ES 2 637 825 T3

```

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
  <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pFMV único mejorado
        entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

<400> 11
10 gaattcgtca acatcgagca gctggccttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtgcaga      60
   attgttaggc gcacctacca aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc      120
   tctagtacaa gtggggaaca aaataacgtg gaaaagagct gtcctgacag ccactcact      180
15 aatgcgtatg acgaacgcag tgacgaccac aaaagattgc ccgggtaate cctctatata      240
   agaaggcatt cattcccat tgaaggatca tcagatactc aaccaatatt tctcactcta      300
20 agaaattaag agctttgtat tcttcaatga gggctaagac ccaagctt      348

<210> 12
<211> 562
25 <212> ADN
  <213> secuencia artificial

<220>
<221> fuente
30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pFMV doble mejorado
        entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

<400> 12
35 gaattcgtca acatcgagca gctggccttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtgcaga      60
   attgttaggc gcacctacca aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc      120
   tctagtacaa gtggggaaca aaataacgtg gaaaagagct gtcctgacag ccactcact      180
40 aatgcgtatg acgaacgcag tgacgaccac aaaagattgc ccaacatcga gcagctggct      240
   tgtggggacc agacaaaaaa ggaatggtgc agaattgtta ggcgcaccta ccaaagcat      300
45 ctttgccttt attgcaaaga taaagcagat tcctctagta caagtgggga acaaaataac      360
   gtggaaaaga gctgtcctga cagcccactc actaatgcgt atgacgaacg cagtgcacgac      420
   cacaaaagat tgcccgggta atccctctat ataagaaggc attcattccc atttgaagga      480
50 tcatcagata ctcaaccaat atttctcact ctaagaaatt aagagctttg tattcttcaa      540
   tgagaggcta agaccaagc tt      562

55 <210> 13
   <211> 274

```

ES 2 637 825 T3

```

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
  <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pPClSV único mejorado
    entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

<400> 13
10 gaattcaatt cgtcaacgag atcttgagcc aatcaaagag gaggatggtt gacctaaagc      60
   aataatggag ccatgacgta agggttacg cccatacgaa ataattaaag gctgatgtga      120
15 cctgtcggtc tctcagaacc ttactttttt atatttggcg tgtatttttta aatttccacg      180
   gcaatgacga tgtgacctgt gcatccgctt tgccataaaa taagtttttag ttgtattga      240
   tcgacacgat cgagaagaca cggccataaa gctt                                     274
20

<210> 14
<211> 452
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: pPClSV doble mejorado
30 entre los sitios de EcoR1 y Hind3"

<400> 14

35 gaattcgtca acgagatctt gagccaatca aagaggagtg atgtagacct aaagcaataa      60
   tggagccatg acgtaagggc ttacgcccat acgaaataat taaaggctga tgtgacctgt      120
   cggctctctca gaacctttac tttttatggt tggcgtgtat ttttaaattt ccacggcaat      180
40 gacgatgtga cccaacgaga tcttgagcca atcaaagagg agtgatgtag acctaaagca      240
   ataatggagc catgacgtaa gggcttacgc ccatacgaaa taattaaagg ctgatgtgac      300
   ctgtcgggtct ctcagaacct ttacttttta tatttggcgt gtatttttaa atttccacgg      360
45 caatgacgat gtgacctgtg catccgcttt gcctataaat aagtttttagt ttgtattgat      420
   cgacacggtc gagaagacac ggccataagc tt                                     452
50

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> secuencia artificial
55

<220>
<221> fuente

```

ES 2 637 825 T3

```

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de
        aminoácidos del péptido señal de la patatina"

<400> 15
5 Met Ala Thr Thr Lys Ser Phe Leu Ile Leu Phe Phe Met Ile Leu Ala
  1          5          10          15

10 Thr Thr Ser Ser Thr Cys Ala
   20

15 <210> 16
    <211> 69
    <212> ADN
    <213> secuencia artificial

20 <220>
    <221> fuente
    <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia no optimizada
        de la patatina de tabaco (ligeramente modificada) como en C148 (frente a
        la cadena pesada)"

25 <400> 16

    atggccacta ctaaactctt tttaatttta ttttttatga tattagcaac tactagtcca      60

30 acatgtgct                                     69

    <210> 17
    <211> 69
35 <212> ADN
    <213> secuencia artificial

    <220>
    <221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia optimizada de
        la patatina de tabaco como en C148 (frente a la cadena ligera)"

    <400> 17

45 atggccacta ctaagtcctt ccttatcctc ttcttcatga tccttgctac tacttcttct      60

    acatgtgct                                     69

50 <210> 18
    <211> 1356
    <212> ADN
    <213> secuencia artificial

55 <220>
    <221> fuente

```

ES 2 637 825 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de la cadena pesada madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148"

<400> 18

5	caagttcaac ttcaacaacc aggtgctgaa cttgttaagc ctggtgcttc tgttaagatg	60
	tcttgcaagg cttctggata cactttcaca tcctacaaca tgcattgggt taagcaaact	120
10	ccaggacgtg gacttgaatg gattggagct atctaccctg gaaacggtga tacttcctac	180
	aaccagaagt tcaagggaaa ggctactctt actgctgata agtcctcttc cactgcttac	240
15	atgcaacttt cttcactcac ttccgaggat tctgctgttt attactgcgc taggtccact	300
	tattatggtg gagattggta cttcaatgtt tggggagctg gaactactgt tactgtgtct	360
	gctgcttcta ctaagggacc atctgttttt ccacttgctc catcttctaa gtctacttcc	420
20	ggtggaactg ctgctcttgg atgccttgtg aaggattatt tcccagagcc agtgactgtt	480
	tcttggaact ctggtgctct tacttctggg gtccacactt tcccagctgt tcttcagtca	540
	tctggacttt actccctttc ttctgttggt actgtgccat cttcttcact tggaaactcag	600
25	acttacatct gcaacgttaa ccacaagcca tctaacacaa aagtggataa gaaggcagag	660
	ccaaagtctt gtgataagac tcatacttgt ccaccatgtc cagctccaga acttcttggt	720
30	ggtccatctg ttttcttggt ccaccaaag ccaaaggata ctctcatgat ctctaggact	780
	ccagaagtta cttgcgttgt tgtggatgtt tctcatgagg acccagaggt taagttcaac	840
	tgggtacgtg atggtgttga agttcacaa gctaagacta agccaagata ggaacagtac	900
35	aactctactt accgtgttgt gtctgtgctt actgttcttc accaggattg gcttaacgga	960
	aaagagtaca aatgcaaggt ttccaataag gctttgccag ctccaattga aaagactatc	1020
40	tccaaggcaa aaggacagcc tagagagcca caggtttaca ctcttcacc atctagagat	1080
	gagcttacta agaaccaggt ttcccttact tgtcttgtga agggattcta cccatctgat	1140
	attgctgttg agtgggagtc aaacggacag cctgagaaca actacaagac tactccacca	1200
45	gtgcttgatt ctgatgggtc cttcttcctc tactccaaac tctactgtga taagtctaga	1260
	tggcagcagg gaaatgtttt ctcttgctcc gttatgcatg aggctctcca taatcactac	1320
50	actcagaagt ccctttcttt gtctcctgga aagtga	1356

<210> 19

<211> 450

55 <212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 637 825 T3

<220>

<221> fuente

<223> / Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de la cadena pesada madura del rituximab"

5

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

10

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

15

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

25

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

40

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

45

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

50

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

55

ES 2 637 825 T3

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

ES 2 637 825 T3

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

5 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

10 Gly Lys
450

15 <210> 20
<211> 642
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de la cadena ligera madura del rituximab (optimizada para tabaco) como en C148"

25 <400> 20
cagattgtgc tttctcagtc tccagctatt ctttctgctt ccccaggtga aaaggttaca 60
atgacttgcc gtgcttcttc ttctgtgtcc tacattcatt ggttccaaca gaagccagga 120
30 tcttctccaa agccatggat ctacgctact tctaaccttg cttctggtgt tccagttagg 180
tttctctggat ctggatctgg tacttcttac tcccttacta tttctagagt ggaggctgaa 240
gatgctgcta cttactactg ccaacagtgg acttctaadc caccaacttt cggagggtga 300
35 actaagcttg agatcaagag gactgttgct gctccatctg tgtttatttt cccaccatct 360
gatgagcaac ttaagtctgg aactgcttct gttgtgtgcc ttctcaaca tttctaccca 420
40 aggggaagcta aggttcagtg gaaagtggat aatgctctcc agtctggaaa ttctcaagag 480
tctgtgactg agcaggattc taaggattcc acttactccc tttcttctac tcttactctc 540
tccaaggctg attatgagaa gcacaagggt tacgcttgcg aagttactca tcagggactt 600
45 tcttcaccag tgacaaagtc cttcaaccgt ggagagtgtt ga 642

50 <210> 21
<211> 213
<212> PRT
<213> secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera madura del rituximab"

ES 2 637 825 T3

<400> 21

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

REIVINDICACIONES

1. Un método basado en la expresión transitoria para producir grandes cantidades de un polipéptido heterólogo en *Nicotiana tabacum* que comprende las etapas de:
 - (i) aplicar una prueba de necrosis para preseleccionar una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de una planta de *Nicotiana tabacum* y una cepa seleccionada de una especie de *Agrobacterium*, dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar, muestra menos de 10 % de necrosis 5 días después que las hojas de dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar se han inyectado mediante jeringa con la cepa de *Agrobacterium* seleccionada a una densidad celular de DO_{600} de 0,32, en donde la necrosis se determina mediante la medición de las áreas de una o más hojas necróticas y las áreas totales de las una o más hojas que se han infiltrado por células de *Agrobacterium*;
 - (ii) infiltrar una planta completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* con una suspensión de la cepa seleccionada de la especie de *Agrobacterium* a una DO_{600} de entre 0,1 y 4,0, donde dicha cepa comprende una secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido;
 - (iii) incubar la planta infiltrada durante un período de entre 5 días y 10 días en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos expresable en la planta infiltrada y la acumulación del polipéptido heterólogo; y, opcionalmente;
 - (iv) comprende además después de la etapa (iii), una etapa (iv) para infiltrar la planta infiltrada completa con *Agrobacterium* con una o más enzimas que degradan la pared de las células vegetales;
 en donde el polipéptido heterólogo se expresa en una cantidad de al menos 200 mg por kg de masa de tejido vegetal.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
 - i. la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido se clona en un vector binario de tamaño mínimo que comprende elementos de secuencia que son esenciales para el mantenimiento y la replicación del plásmido en células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, y para la transferencia de un T-ADN a una célula vegetal de tabaco, y, opcionalmente, un gen marcador de selección en plantas, en donde la proporción de los elementos de secuencia esenciales representa al menos el 70 % de los nucleótidos de todo el vector binario de tamaño mínimo sin la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido; y/o
 - ii. la suspensión de células de *Agrobacterium* usada en la etapa (ii) para infiltrar dicha variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* tiene una densidad celular (DO_{600}) en el intervalo de 0,3 a 0,9.
3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
 - i. un supresor de silenciamiento génico se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* cuando se expresa la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y/o
 - ii. la secuencia de nucleótidos que codifica al supresor de silenciamiento génico se ubica en un primer vector binario y la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo se ubica en un segundo vector binario.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una proteinasa del componente asistente (HcPro) de un potyvirus
 - i. se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* cuando se expresa la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y/o
 - ii. se expresa transitoriamente en dicha variedad, línea de mejoramiento o cultivar seleccionados de una planta de *N. tabacum* mediante el uso de un segundo vector binario que está separado del primer vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido heterólogo; y
 - iii. se codifica por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 5.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en donde el primer vector binario se proporciona en una primera cepa de *Agrobacterium* y el segundo vector se proporciona en una segunda cepa de *Agrobacterium* y en donde en la etapa (ii), la relación de las células de la primera cepa de *Agrobacterium* que comprende el primer vector binario que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga, con respecto a las células de la segunda cepa de *Agrobacterium* que comprende el segundo vector binario, está en un intervalo de 3:1 a 1,6:1.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* proporcionados en la etapa i) es una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* seleccionados del grupo que consiste en la línea de *N. tabacum* DAC Mata Fina, PO2, BY-64, AS44, RG17, RG8, HB04P, Basma Xanthi BX 2A, Coker 319,

- Hicks, McNair 944 (MN 944), Burley 21, K149, Yaka JB 125/3, Kasturi Mawar, NC 297, Coker 371 Gold, PO2, Wisliça, Simmaba, Turkish Samsun, AA37-1, B13P, F4 del cruce BU21 x Hoja Parado línea 97, Samsun NN, Izmir, Xanthi NN, Karabalgar, Denizli, PO1, PM016, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41798; PM021, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41799; PM092, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41800; PM102, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41801; PM132, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41802; PM204, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41803; PM205, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41804; PM215, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41805; PM216, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41806; y PM217, cuyas semillas se depositaron con el número de registro del NCIMB 41807, y en donde el depositario de semillas es NCIMB en Aberdeen, Escocia.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una cepa seleccionada del grupo que consiste en AGL1, EHA105, GV2260, GV3101 y Chry5.
 8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *Nicotiana tabacum* y la cepa de *Agrobacterium* seleccionada que se proporciona en la etapa i) es una combinación seleccionada del grupo que consiste en línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, línea PM132 de *Nicotiana tabacum* con cepa AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* y línea PM204 de *Nicotiana tabacum* con cepa AGL1 de *Agrobacterium*.
 9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido heterólogo es
 - i. un factor de crecimiento, receptor, ligando, molécula de señalización; quinasa, enzima, hormona, supresor de tumor, proteína de coagulación de la sangre, proteína del ciclo celular, proteína metabólica, proteína neuronal, proteína cardíaca, proteína deficiente en estados de enfermedad específicos, anticuerpos, inmunoglobulinas, antígenos, proteínas que proporcionan resistencia a enfermedades, proteínas para la terapia de sustitución en enfermedades genéticas humanas, proteínas antimicrobianas, interferones, y citocinas; y/o
 - ii. una hemaglutinina de influenza o un fragmento inmunogénico de esta.
 10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las plantas se exponen a la luz antes de la infiltración, de manera que la conductancia estomática esté en un intervalo de entre 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.
 11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la etapa iii) comprende
 - i. incubar la planta en condiciones de luz diurna durante siete a nueve horas por día; y/o
 - ii. incubar dicha planta infiltrada en una posición invertida.
 12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además (a) antes de la infiltración, cultivar la planta de tabaco completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *N. tabacum*, a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, o (b) después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, o (c) antes de la infiltración, cultivar la planta de tabaco completa de la variedad, línea de mejoramiento, o cultivar seleccionados de *N. tabacum* a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado, y después de la infiltración, incubar las plantas completas infiltradas a una densidad de al menos 100 plantas por metro cuadrado.
 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las plantas se cultivan en una densidad de entre 200 y 600 plantas por metro cuadrado.
 14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la combinación seleccionada de una variedad, línea de mejoramiento, o cultivar de *Nicotiana tabacum* y una cepa de una especie de *Agrobacterium* es una combinación, que da como resultado (a) la acumulación de la proteína heteróloga a un nivel que es al menos 25 % del que puede obtenerse en *N. benthamiana* cuando se usan la misma secuencia de nucleótidos expresable y las mismas etapas de infiltración e incubación o (b) la acumulación de proteína fluorescente verde a al menos 1 % del total de proteína soluble de la planta infiltrada, cuando la secuencia de nucleótidos expresable codifica una proteína fluorescente verde, y se usan las mismas etapas de infiltración e incubación.
 15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la etapa (ii) comprende infiltrar la planta completa mediante uno o más ciclos de presión en donde al menos uno de los ciclos de presión comprende un aumento de la presión con respecto a la presión atmosférica.

- 5 16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la secuencia de nucleótidos expresable que codifica al polipéptido se clona en un vector binario que comprende una región de T-ADN que comprende una o dos o más copias de un promotor FLt o un fragmento funcional de este, en donde el promotor FLt es el de MMV, FMV o PCISV, particularmente un promotor FLt según se proporciona en la sec. con núm. de ident.: 9, la sec. con núm. de ident.: 10, la sec. con núm. de ident.: 11, la sec. con núm. de ident.: 12, la sec. con núm. de ident.: 13, o la sec. con núm. de ident.: 14.

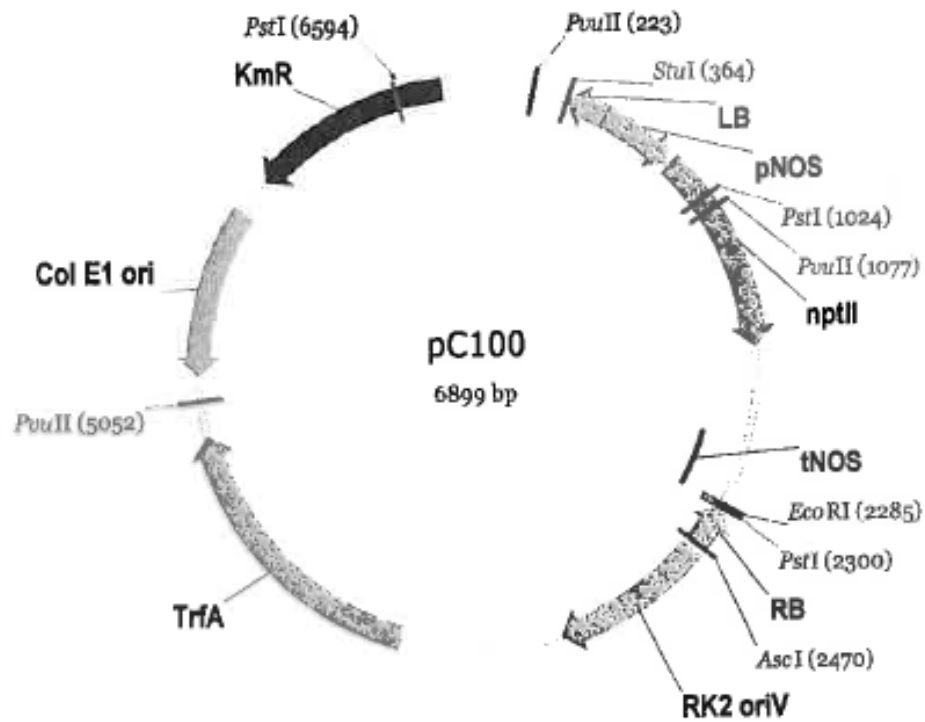


Figura 1A

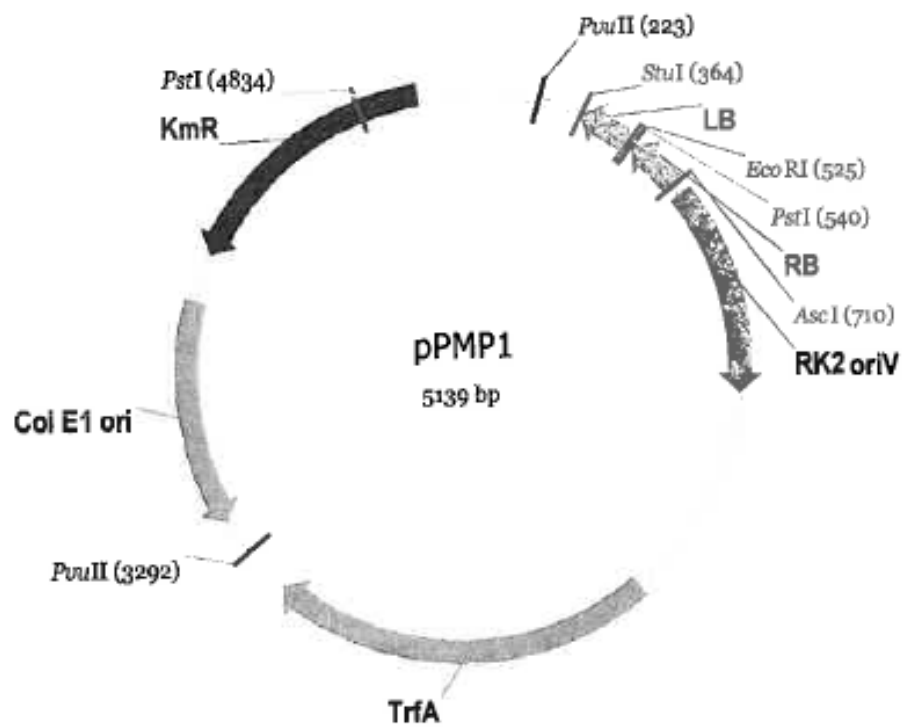
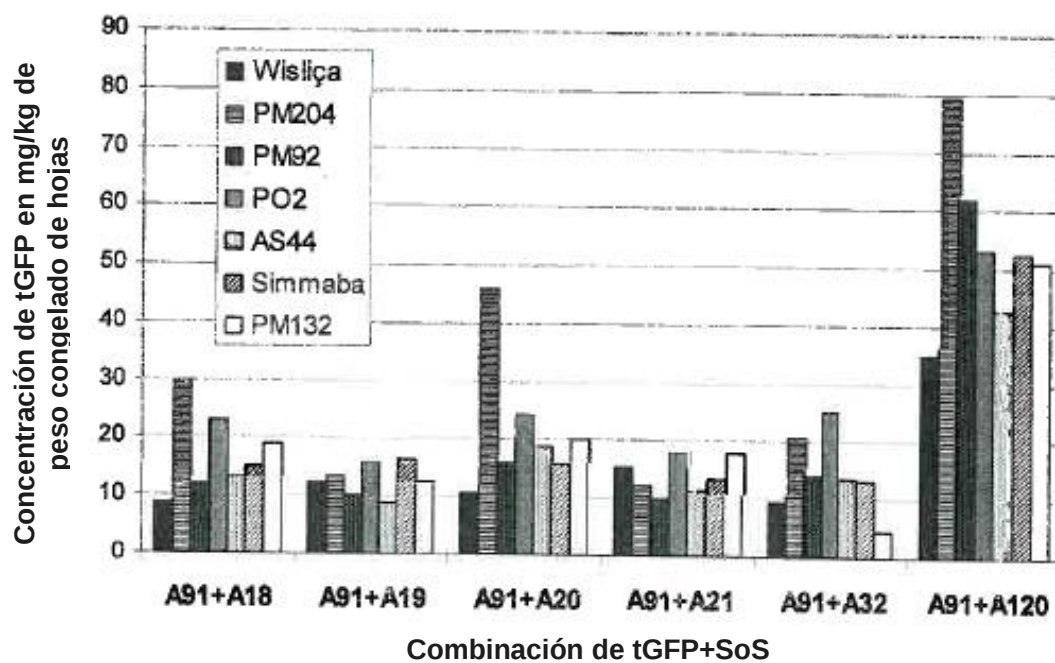


Figura 1B

*Figura 2*

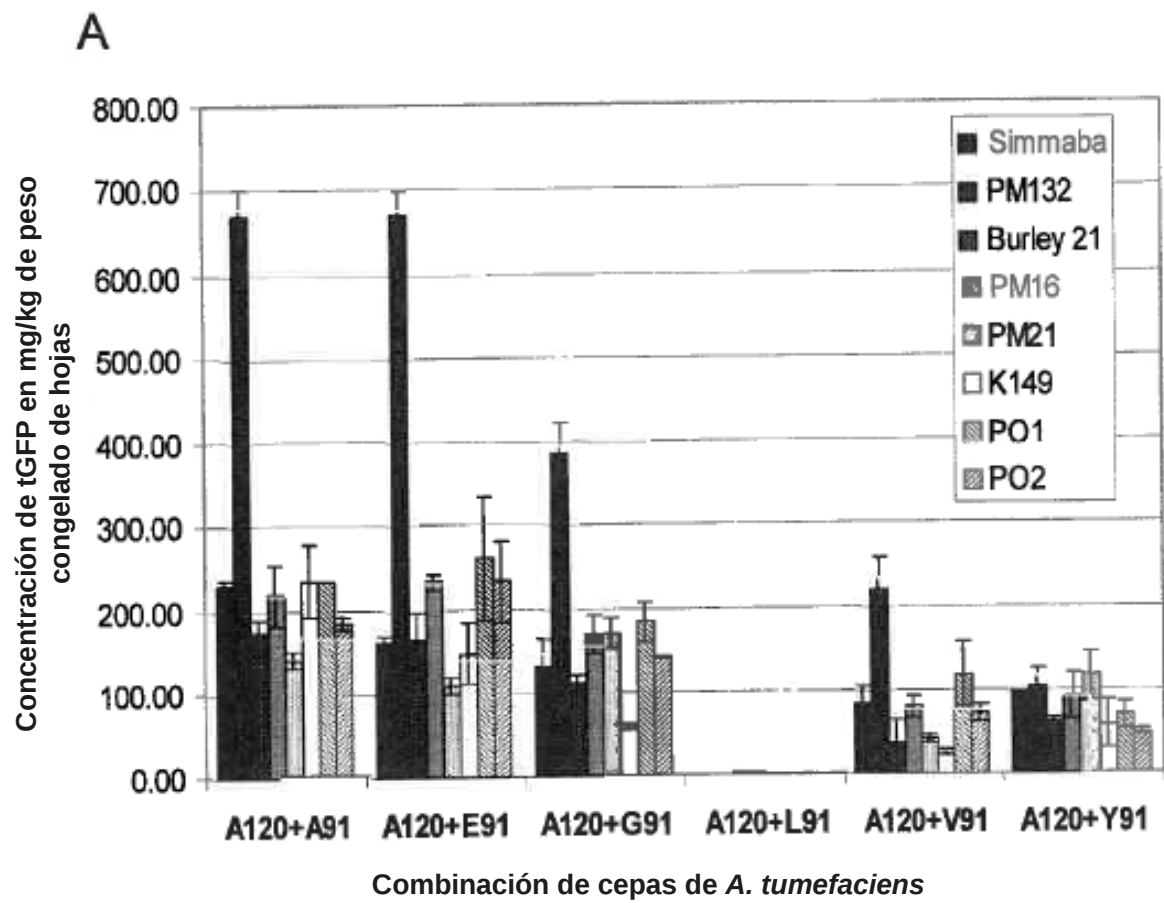


Figura 3A

B

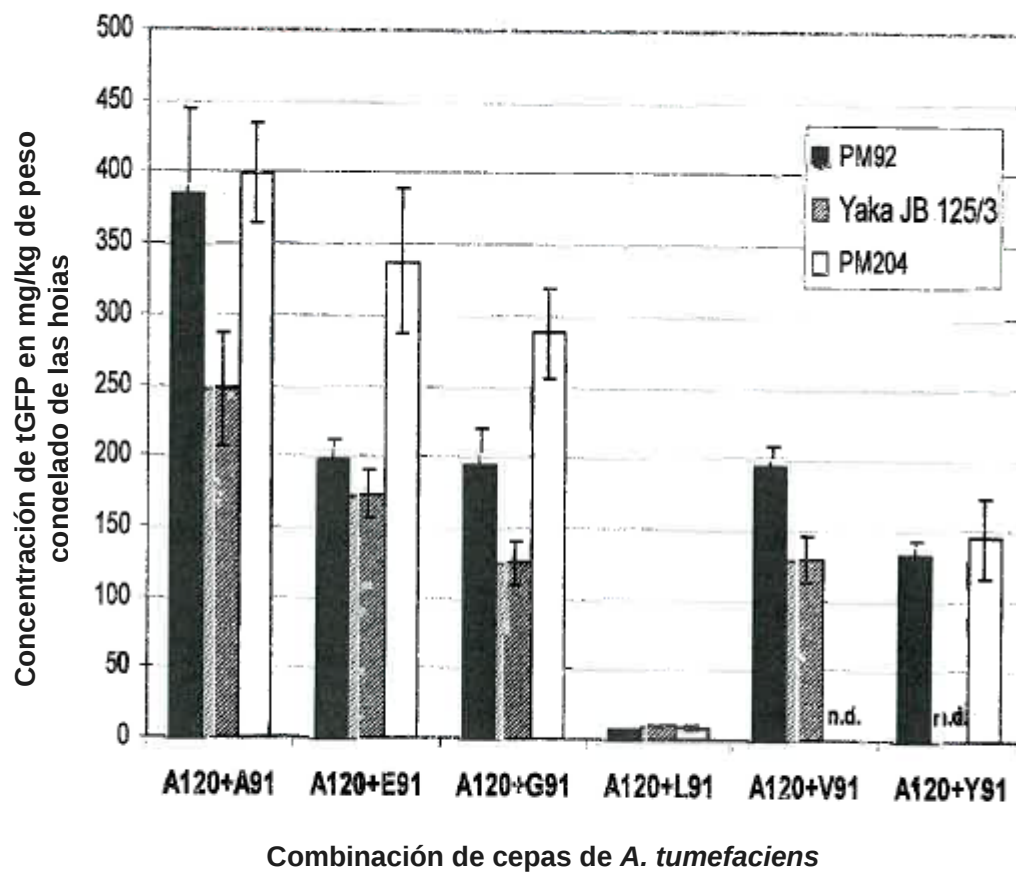


Figura 3B

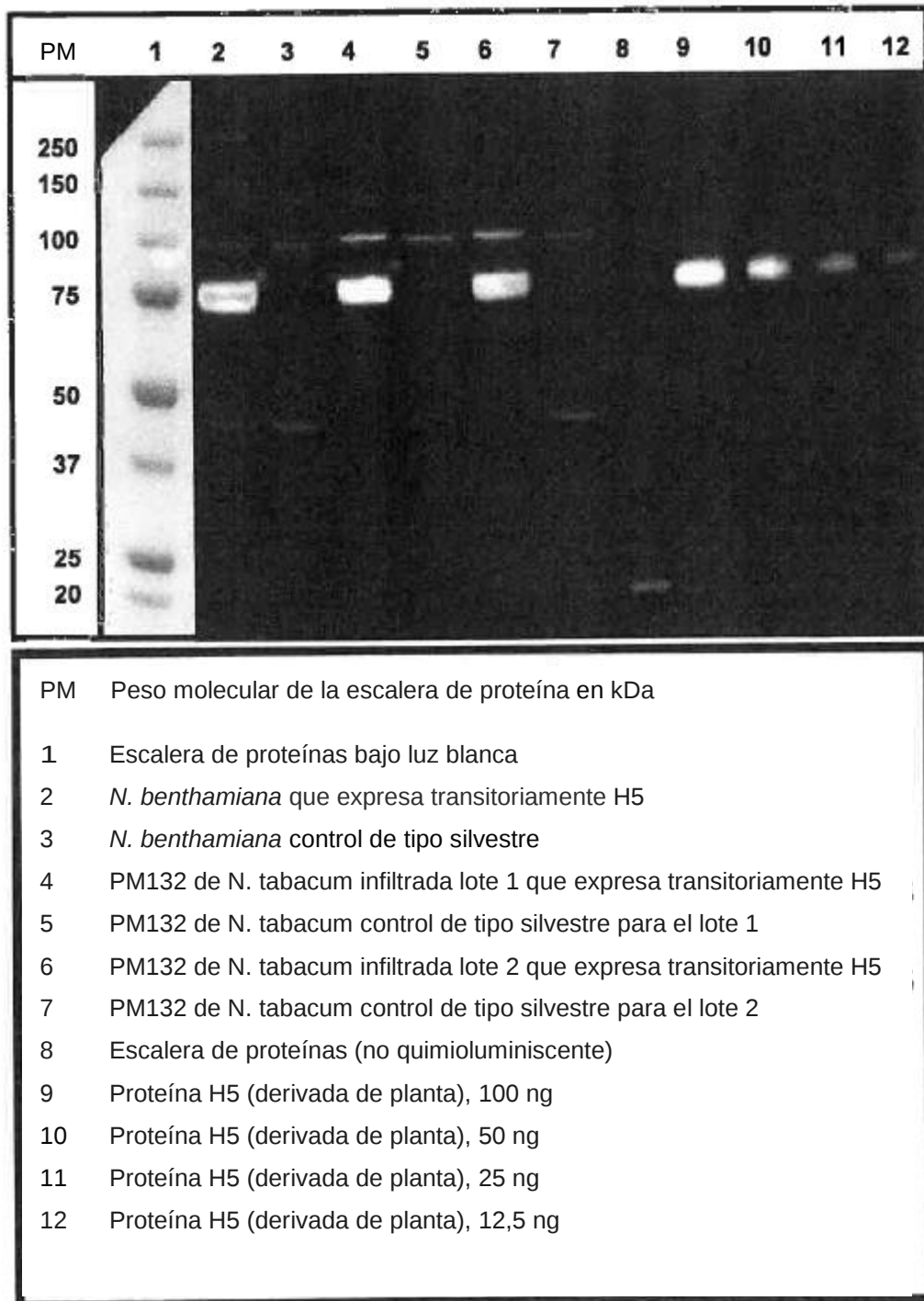


Figura 4

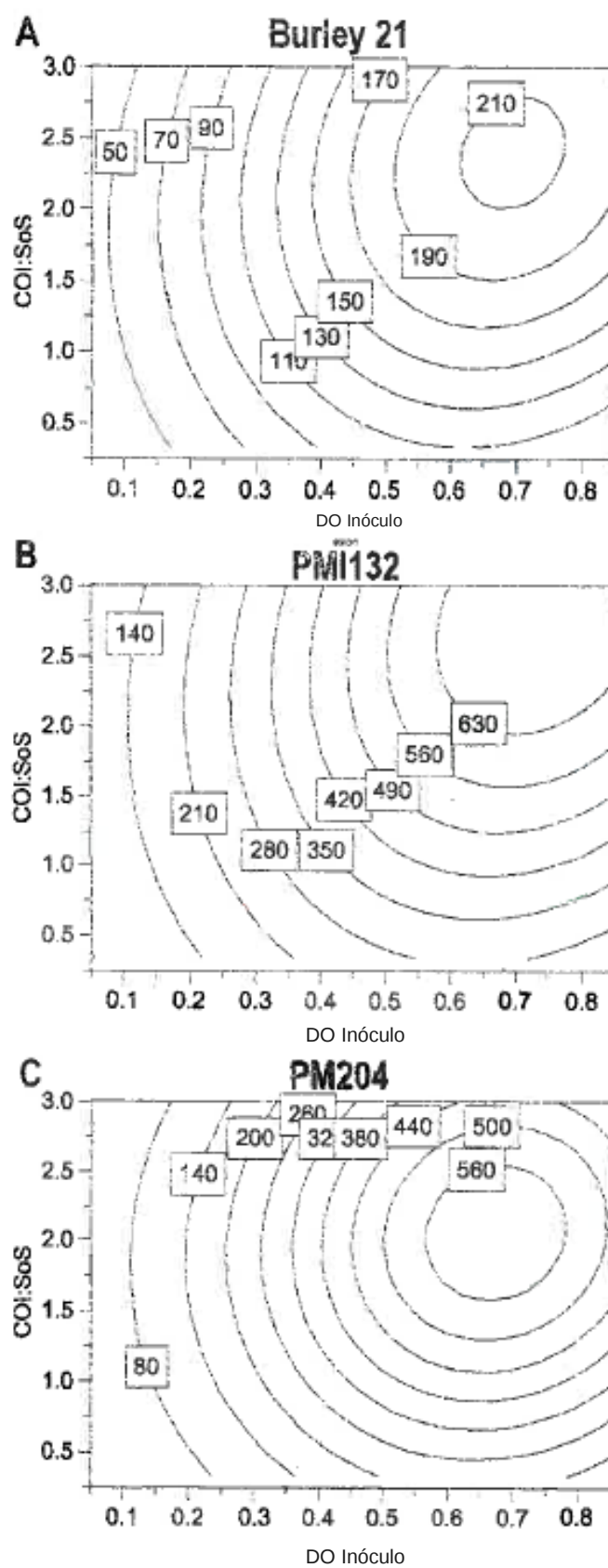


Figura 5

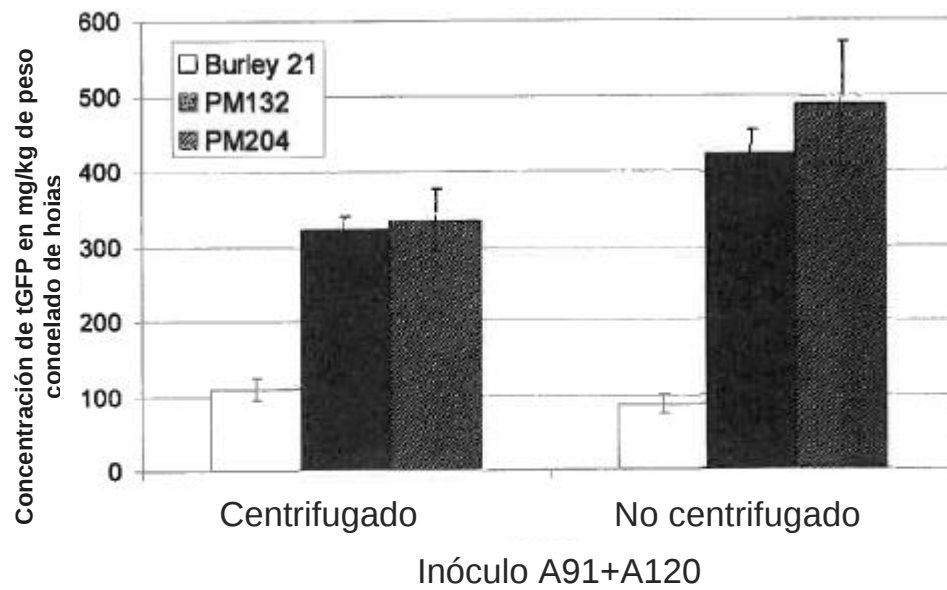


Figura 6

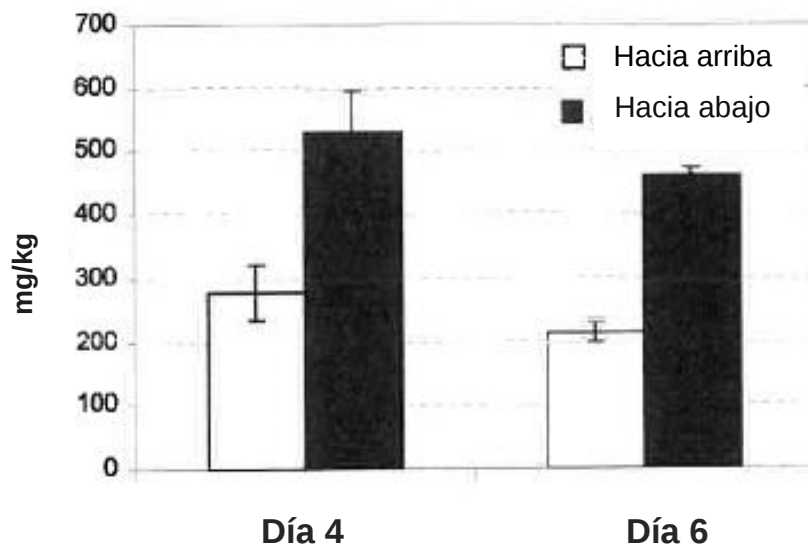
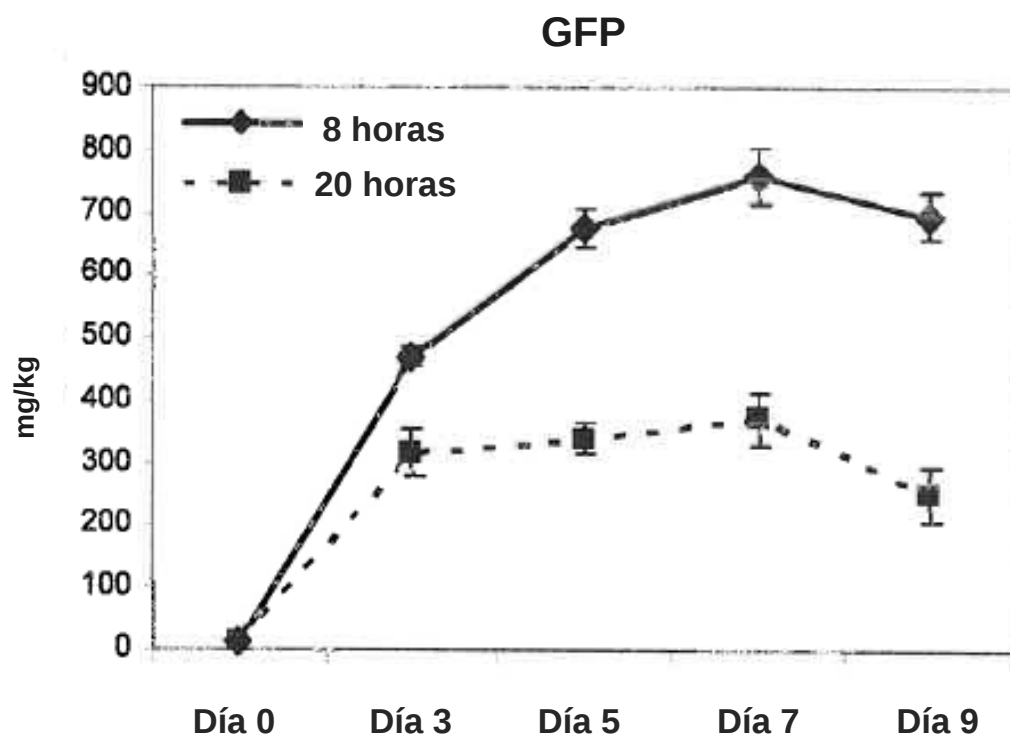


Figura 7

*Figura 8*