

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 777**

21 Número de solicitud: 201130078

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

27.06.2008

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2012

Fecha de la concesión:

07.06.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.06.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 200801935 27.06.2008

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA (50.0%)
Campus de Arrosadía s/n (OTRI) Edificio del
Rectorado
31006 Pamplona (Navarra) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MINGO CASTEL, Angel;
FARRÁN BLANCH, Inmaculada y
SANZ BARRIO, Ruth**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

54 Título: **TIORREDOXINAS PLASTIDIALES: SOBREEXPRESIÓN Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.**

57 Resumen:

Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas. Se describe la secuencia genética de la tiorredoxina f (Trx) cloroplástica de la especie *N. tabacum*, su método de clonación, expresión en plastidios y aplicaciones. Se proporcionan además los vectores de coexpresión plastidial que contienen moléculas de ADN que codifican Trx f, los hospedadores que los incorporan, especialmente *E. coli* y, particularmente, plantas transgénicas obtenidas con tales vectores, así como su método de obtención y su aplicación en la sobreexpresión de Trx en forma soluble y activa en dichas plantas y en la producción incrementada de almidón y sacarosa.

Los citados vectores plastidiales se aplican además a la producción plastidial incrementada de proteínas heterólogas recombinantes, coexpresadas con las secuencias de Trx f, concretamente albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas. Se describen también métodos de obtención de proteínas heterólogas coexpresadas con Trx f, biológicamente activas y en conformación nativa; así como la obtención de hCT1 recombinante en forma soluble y con bioactividad incrementada.

ES 2 384 777 B1

DESCRIPCIÓN

Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la Biotecnología, y específicamente a vectores plastidiales específicos que incorporan la secuencia genética de la tiorredoxina *f* (Trx) cloroplástica de la especie *N. tabacum*, su método de clonación, expresión en plastidios y aplicaciones. La invención proporciona además los hospedadores que incorporan dichos vectores y, particularmente, plantas transgénicas obtenidas con tales vectores, así como su método de obtención y su aplicación a la sobreexpresión de Trx *f* en forma soluble y activa en dichas plantas y a la producción incrementada de almidón y sacarosa.

10 La invención se aplica además a la producción plastidial incrementada de proteínas heterólogas recombinantes, coexpresadas con las secuencias de Trx, concretamente albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas. Se describen también métodos de obtención de proteínas heterólogas coexpresadas con Trx, biológicamente activas y en conformación nativa; así como la obtención de proteínas recombinantes en forma soluble y con bioactividad incrementada.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas termoestables (12 kDa) presentes en todos los organismos que catalizan intercambios tiol-disulfuro y regulan el ambiente redox de la célula, controlando un amplio rango de procesos bioquímicos. Esta regulación depende, en la mayoría de los casos, de la capacidad de las tiorredoxinas de reducir puentes disulfuro de proteínas diana. En plantas, el sistema tiorredoxina es particularmente complejo, ya que existen múltiples isoformas y múltiples genes que codifican para cada tipo de tiorredoxina; siendo todos estos genes codificados nuclearmente, independientemente de su localización subcelular.

20 La multiplicidad de isoformas de tiorredoxinas encontradas en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*, cuatro isoformas de tiorredoxina *m*, dos *f*, una *x*, y dos *y* hace que surjan dudas respecto a la especificidad y las funciones de las mismas. Las tiorredoxinas más estudiadas hasta la fecha han sido las tiorredoxinas *m* y *f*, por ser las únicas asociadas a la regulación dependiente de la luz del metabolismo del carbono, a través del ciclo de las pentosas fosfato y del ciclo C₄.

25 Las tiorredoxinas cloroplásticas se denominaron *m* y *f* en función de la enzima que son capaces de activar, la NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH) y la fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa) respectivamente. Estudios filogenéticos y comparaciones estructurales han demostrado que las tiorredoxinas *m* tienen un origen procariota, están codificadas nuclearmente y se encuentran asociadas débilmente a las membranas externas del tilacoide. Las tiorredoxinas *f* están también codificadas nuclearmente y tienen un origen eucariota.

30 Las tiorredoxinas cloroplásticas pueden regular procesos tan importantes como: el ciclo de Calvin; el ciclo C₄; el metabolismo del nitrógeno y del azufre; la biosíntesis de ácidos grasos, isoprenoides, tetrapirroles y vitaminas; la traducción; el ciclo de las pentosas fosfato; el estrés oxidativo; el ensamblaje/plegado de proteínas y degradación de las mismas; la degradación del almidón; la glicólisis; la división plastidial y la replicación del DNA. Recientemente se ha descrito la existencia de un completo sistema ferredoxina/tiorredoxina también en amiloplastos, regulando la actividad de enzimas implicadas en procesos tales como el metabolismo del almidón; la biosíntesis de lípidos, aminoácidos y nucleótidos; el plegado de proteínas y otras reacciones varias.

35 A pesar de la existencia de múltiples estudios sobre la estructura de las tiorredoxinas cloroplásticas, sus funciones y su regulación en la planta, es difícil conocer qué tiorredoxina actúa en cada proceso *in vivo*, debido a la pérdida de especificidad de las tiorredoxinas *m* y *f* mutadas usadas en proteómica y cromatografía de afinidad.

Transformación plastidial

40 La información genética de las plantas se encuentra distribuida en tres compartimentos celulares: el núcleo, las mitocondrias y los plastidios. El genoma plastidial (plastoma) es circular de doble hélice, y en plantas superiores difiere en tamaño según la especie entre 120 y 160 kb. El número de copias del plastoma en el plastidio es variable, dependiendo del tipo de plastidio y del tipo de célula, pudiendo llegar a contener hasta 10.000 copias en una célula del mesófilo de la hoja.

45 En el proceso de transformación plastidial, la integración del ADN en el genoma plastidial se produce por recombinación homóloga. Se han probado hasta 14 lugares distintos de inserción en los que no ha habido efectos negativos, si bien los más utilizados han sido la región intergénica del *trnI-trnA* y la del *rrn16/trnV-rps7/12*. El método más utilizado para insertar los vectores en el ADN plastidial ha sido el bombardeo con helio a alta presión (método biolístico). Para detectar la regeneración de transformantes se suelen utilizar marcadores de selección. El más eficiente hasta el momento ha sido el gen *aadA* de bacterias, que codifica la enzima 3'-adenilil-transferasa, y es capaz de inactivar antibióticos tipo aminoglicósidos, como la espectinomicina y la estreptomycinina.

Para lograr grandes niveles de acumulación de proteína recombinante, los transgenes se expresan bajo promotores constitutivos fuertes que aseguran altos niveles de ARNm. También se suelen incluir regiones 5'UTR que promuevan una traducción activa y estabilicen los transgenes. La elección de estos elementos resulta crucial para determinar las cantidades finales de acumulación de proteína, pues el inicio de la traducción es el paso limitante. En cambio, la región 3'UTR es importante para estabilizar el ARNm y no parece influir en el nivel de expresión de los transgenes.

La transformación plastidial presenta una serie de ventajas, incluida la capacidad de obtener elevados niveles de expresión de la proteína recombinante, pudiendo llegar a alcanzar hasta el 46% de la proteína soluble total, debido probablemente al elevado número de copias del transgén en la célula. Otras ventajas destacables son: la ausencia de "efecto posición", permitiendo una expresión uniforme y reproducible del gen; la baja probabilidad en el flujo de transgenes a otros cultivos o especies salvajes relacionadas, ya que en la mayoría de las especies cultivadas los plastomas son heredados por vía materna; y la capacidad de procesamiento policistónico, que los capacita para procesar varios transgenes bajo el control de un único promotor.

Las aplicaciones biotecnológicas de la transformación plastidial son amplias (Bock et al, 2001, Trends Biotech. **22**, 311-318; Maliga, 2004, Annu. Rev. Plant. Biol. **55**, 289-313). Por una parte, han sido numerosos los estudios para dotar de ventajas agronómicas a los cultivos, como resistencia a insectos o a herbicidas y fitorremediación. También se ha publicado la expresión de moléculas de interés industrial como la xilanas, trehalosa o el PHB. En una revisión (Heifetz, 2000, Biochim. **82**, 655-666), se recogen además otros trabajos de expresión plastidial que ya han sido patentados (E5 celulasa, aprotinina bovina y tolerancia a herbicidas norflorazon y bromoxynil). La aplicación más extendida ha sido la producción de compuestos biofarmacéuticos en plastidios, probablemente porque las expectativas de mercado son altas y pueden esperarse grandes beneficios (Bock, 2007 Curr. Opin. Biotechnol. **18**, 100-106; Daniell, 2006, Biotech. J. **1**, 1071-1079).

Sobreexpresión de Trx recombinantes en plantas

Existen muy pocos trabajos en los que se han sobreexpresado tiorredoxinas en plantas. Cho et al (Cho et al, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14641-14646) sobreexpresaron una tiorredoxina *h* de trigo en el endospermo de cebada transgénica, obteniendo un incremento de hasta 4 veces en la actividad de la 'starch-debranching enzyme', enzima que rompe de manera específica los enlaces alfa-1,6 en el almidón, en el endospermo de granos transgénicos germinados. También se ha visto que se aceleraba la emergencia de la radícula durante el proceso de germinación (Wong et al, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 16325-16330). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de tiorredoxina *h* en cereales (trigo y cebada) puede utilizarse para mejorar la calidad harino-panadera del trigo, aumentando la fuerza de la masa (Joudrier et al, 2005, Biotech. Adv. **23**, 81-85) y para mitigar la respuesta alérgica a las proteínas del trigo (Buchanan et al, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 5372-5377) produciendo alimentos hipoalérgicos más digestivos (Joudrier et al, citado anteriormente). El documento WO 00/14239, se refiere a un fragmento de ADN que codifica la Trx *h*, así como a su uso para la producción de niveles alterados de la tiorredoxina en una célula hospedadora transformada. Todas estas publicaciones se refieren a la Trx *h*, citosólica, con distinta localización subcelular y propiedades bioquímicas que las Trx plastidiales, además, a diferencia de la invención, en ninguna de ellas se hace referencia a la expresión en cloroplastos, ni a Trx cloroplásticas. Hasta la fecha no se ha publicado la sobreexpresión de ninguna tiorredoxina cloroplástica en cloroplastos de plantas.

Relación entre Trx y producción de azúcares y almidón

El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en plantas. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros) y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es utilizado frecuentemente en la industria papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y en la producción de biocombustibles. El estudio de los procesos implicados en la síntesis de este polisacárido constituye un tema de vital importancia en diversos ámbitos de la producción industrial.

El metabolismo del carbono empieza en los cloroplastos mediante la fijación de carbono inorgánico en el complejo proceso de la fotosíntesis. El CO₂ atmosférico se incorpora al ciclo de Calvin y, posteriormente, es exportado al citosol en forma de triosa-fosfato para convertirse en sacarosa, que constituye en muchas plantas la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la misma.

Las tiorredoxinas plastidiales, activadas por la luz, desempeñan un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos. Concretamente, las tiorredoxinas *f* desempeñan un papel fundamental en la activación específica de muchos de los enzimas implicados en el ciclo de Calvin, por lo que se considera que ejercen algún control en la asimilación fotosintética del carbono. Se ha demostrado una activación específica para fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa), Rubisco-activasa, fosforibuloquinasa (PRK), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa (SBPasa). Las tiorredoxinas *m* parecen mostrar más especificidad en la activación de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), involucrada en el catabolismo de azúcares a través del ciclo de las pentosas fosfato en el estroma, y de la NADP-malato-deshidrogenasa (NADP-MDH), enzima clave en la

asimilación de carbono en las plantas C_4 y que participa en la exportación al citosol de poder reductor en las plantas C_3 . La evidencia de la que se dispone actualmente apunta a un papel estimulador de la biosíntesis de carbohidratos por parte de la Trx *f* y de una inhibición de vías catabólicas por la Trx *m*.

Recientemente, gracias a la revolución de la genómica y la proteómica, se han identificado otras enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos que son reguladas por tioredoxinas, como la ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa), que cataliza el primer paso en la biosíntesis del almidón, y la beta amilasa (TR-BAMY) (Buchanan et al, 2002) (Lemaire et al, 2007). Así mismo, las tioredoxinas plastidiales están relacionadas con otros procesos metabólicos, regulando enzimas como la CF_1 ATP sintasa, la acetil-CoA-carboxilasa, que encabeza la síntesis de novo de ácidos grasos, y la 3-desoxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato-sintasa (DAHP sintasa), primera enzima de la vía del ácido shikímico (Lemaire et al, 2007).

Son muchos los trabajos en los que se han sobreexpresado en plantas enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. Gran parte de las patentes y publicaciones científicas relacionadas con la obtención de plantas productoras de almidón giran en torno a la utilización de la AGPasa (Stark et al, 1992, Science **258**, 287-292; Slattery et al, 2000, Trends Plant Sci. **5**, 291-298). Sin embargo, también se ha conseguido aumentar los niveles de almidón mediante la producción de plantas transgénicas que sobreexpresan sacarosa-sintasa (SS) (Baroja-Fernández et al, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 13080-13085). La sobreexpresión de una FBPasa/SBPasa de cianobacterias en cloroplastos de tabaco mediante transformación nuclear mejoró la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas transgénicas (Miyagawa et al, 2001). Sin embargo, cuando esta misma proteína se ha expresado desde el genoma del cloroplasto, a pesar de presentar unos niveles mayores de expresión, no se han observado cambios importantes en fotosíntesis, crecimiento y niveles de azúcares respecto a los obtenidos mediante transformación nuclear (Yabuta et al, 2008).

WO 200036126, **WO 200198509** y **US 7009087** describen plantas transgénicas que incorporan en su genoma nuclear Trx *h* y/o Trx-reductasas, produciendo un incremento en la extractabilidad del almidón de sus semillas, debido a la alteración de la interacción fisicoquímica entre proteínas y almidón dentro de los gránulos de almidón. Sin embargo, este efecto se limita a la facilidad de extracción y no a la producción de almidón propiamente dicha.

A diferencia del estado de la técnica, en la invención se demuestra la producción muy incrementada de azúcares y almidón en plantas transgénicas que incorporan Trx *f* respecto a las correspondientes plantas silvestres, cultivadas en idénticas condiciones.

Producción de proteínas recombinantes en plantas

Las proteínas recombinantes son un componente de gran importancia en investigación, medicina e industria, siendo necesarias para múltiples aplicaciones, incluyendo las terapéuticas, vacunas, anticuerpos monoclonales, hormonas, proteínas de la sangre, agentes de diagnóstico o enzimas, lo que representa una gran demanda para la producción de proteínas recombinantes a escala industrial.

La producción comercial de proteínas heterólogas ha tenido lugar tradicionalmente en fermentadores microbianos (*E. coli* y levaduras principalmente) y en cultivos de células de mamífero. A continuación se detallan los documentos más próximos a la invención:

EP-1609867 describe una construcción y un vector para expresión en *E. coli* y un método para incrementar la producción de polipéptidos recombinantes con elevado rendimiento en el cual una primera secuencia de ácido nucleico codifica una tioredoxina y una segunda secuencia de ácido nucleico codifica otra proteína tal como hemoglobina o un enzima. Se clona en una célula huésped para obtener el producto de interés evitando el estrés oxidativo que se produce como consecuencia de la sobreexpresión (resumen). La expresión de ambos genes está controlada por promotores iguales o diferentes, constitutivos o inducibles y pueden introducirse secuencias activadoras en los extremos 5' de los promotores (párrafos (0044) a (0047)). Los genes se expresan como proteína de fusión formada por tioredoxina y otro polipéptido (párrafo (0062)) que se pueden purificar por cromatografía o cualquier otro método estándar (párrafo (0056)). También está descrito que los genes se pueden coexpresar independientemente (párrafo (0052)), siendo las proteínas obtenidas más solubles que cuando no se expresan conjuntamente con TRX (ya sea en fusión o en coexpresión). Sin embargo, la técnica no se realiza en plástidos vegetales sino en *E.coli*.

Parecida es la enseñanza de la solicitud **US 2002/0146793**, en la que se sugiere la expresión conjunta de una proteína capaz de catalizar la formación de enlaces disulfuro y una proteína heteróloga, siendo el hospedador preferido las levaduras. **WO 92/13955**, por su parte, se refiere específicamente a una proteína de fusión obtenida a partir de una proteína similar a una Trx y la parte codificante de una proteína heteróloga. El hospedador es, de nuevo, una bacteria.

EP0768382: se refiere a 2 vectores que cotransforman *E.coli*. Uno de ellos lleva una construcción para la expresión de TRX y el otro para expresar una proteína de interés.

WO9213955: se refiere a la expresión en *E. coli* de proteínas de fusión que contienen TRX y una proteína de interés en forma estable y soluble. Estas proteínas deben posteriormente ser separadas y plegadas correctamente.

WO9741207: detalla un método para expresar una proteína heteróloga soluble en una bacteria transformada con un vector que contiene un gen que codifica la proteína heteróloga y un gen que codifica una TRX, expresándose ambos separadamente.

US7655436: describe la coexpresión de TRX en *E. coli* con otras proteínas heterólogas en forma de proteínas de fusión. Se obtienen en forma soluble y activa. Menciona el problema de la acumulación en cuerpos de inclusión, pero simplemente con la construcción de fusión soluciona el problema (ver col. 2 ln 7). (La construcción de fusión en plastidios vegetales, descrita en la presente solicitud, no evita la acumulación de la proteína de interés en cuerpos de inclusión).

WO9837208 (EP1007698 y ES2286844): se refiere a la expresión de proteínas heterólogas en un organismo huésped que se transforma con un vector que lleva una construcción con un gen que codifica una TRX y una construcción que lleva el gen de la proteína heteróloga. Refiere el problema de la acumulación en cuerpos de inclusión. El organismo transformado es una levadura.

Estos sistemas de producción en microorganismos presentan ciertas desventajas en cuanto a coste, producción a escala y seguridad biológica, lo que ha llevado a estudiar otras alternativas. La producción de proteínas recombinantes en plantas ha aparecido como una de las plataformas más prometedoras, ya que permite reducir costes a la vez que eliminar riesgos de contaminación con endotoxinas o patógenos humanos. Además, la producción de proteínas recombinantes en plantas permite obtener vacunas orales que pueden ser administradas en crudo después de un dosificado previo. La producción de proteínas terapéuticas en plantas comenzó hace más de una década, y las especies más utilizadas han sido tabaco, maíz, patata, alfalfa, arroz y soja.

Hasta la fecha, la mayoría de las proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico han sido producidas por transformación nuclear. Aunque esta técnica es bien conocida en muchas especies, tiene algunas desventajas, como la producción en gran escala a corto plazo, los bajos niveles de expresión (normalmente menos del 1% de la proteína soluble total), los problemas derivados de las modificaciones post-traduccionales, el silenciamiento o los efectos de posición (Bogorad, 2000, Trends Biotech. **18**, 257-263). Actualmente, el punto más débil de la producción de proteínas recombinantes en plantas es la falta de información en lo referente a los procesos que engloban la estabilidad, extracción, purificación y rendimiento final de la misma, cuestiones de gran importancia para la viabilidad industrial (Fischer et al, 2004, Curr. Op. Plant Biol. **7**, 152-158; Menkhous, 2004, Biotech. Prog. **20**, 1001-1014).

Una variante es la transformación plastidial, con la que ya se ha conseguido expresar varias proteínas de interés biofarmacéutico con niveles muy altos de acumulación.

Se ha descrito la expresión de péptidos eucariotas en plastidios vegetales (**WO 00/03012**) y, en particular, de albúmina sérica (HSA) y cardiotrofina-1 (hCT1) humanas (**US 2006/0253935**, **US 2006/0117412**, **US 2006/0253935**; Fernández San-Millán et al, 2003, Plant Biotech. J. **1**, 71-79; Farran et al, 2008, Plant Biotech. J. **6**(5): 516-27). **WO0357834** (EP1456390): sobre producción de vacunas recombinantes en cloroplastos. No lleva TRX.

WO2007053183: se refiere a un sistema para la expresión multigénica en cloroplastos de tabaco. Se analizan diversas líneas de cloroplastos transgénicos con construcciones multigénicas que contienen las siguientes características: el gen *aadA* que confiere resistencia a la espectinomicina aguas abajo del promotor del gen del RNA 16S constitutivo del cloroplasto (Prr). Los genes heterólogos de interés se disponen aguas abajo del gen *aadA* y están flanqueados por la región *psbA* responsable de la estabilidad en el cloroplasto. En algunos casos el gen heterólogo contiene el promotor *psbA* y su secuencia reguladora 5'UTR. Las construcciones multigénicas se integran mediante recombinación homóloga en la región *trn* del cromosoma plastidial (zona en la que se han integrado con éxito más de 30 genes) (Daniell et al. 2004 a,b). No expresa TRX.

WO0250289: describe un procedimiento para coexpresar en plastidios vegetales una tioredoxina conjuntamente con un segundo polipéptido (pág.14, líneas 11-15). El sistema de expresión, que consiste en una construcción que incluye el promotor *psbA* y una secuencia 5'UTR, se inserta en un plásmido a través de zonas de recombinación homóloga y se expresa en una célula vegetal o en una planta transformada (ver pág. 56, líneas 20 en adelante y pág. 57, párrafo 1). Como activador de la transcripción, utiliza la secuencia de la región G10L de bacteriófago T7 (pág. 58, líneas 1-10). Los péptidos de fusión obtenidos se separan por ruptura enzimática de una secuencia de unión (página 8, párrafo 1).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado la expresión en cloroplastos de proteínas heterólogas con Trx plastidiales. En la presente invención se han coexpresado en plastidios proteínas heterólogas Trx *m* cloroplástica de la invención, observándose diversos efectos totalmente inesperados, como los elevados niveles de expresión de la proteína heteróloga fusionada con la Trx, muy superiores incluso a los obtenidos en cloroplastos aisladamente, en ausencia de dicha Trx.

La acumulación, por transformación pastidial, de altos niveles de proteína recombinante puede acarrear la formación de cuerpos de inclusión (Fernández-San Millán et al, 2003). Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas; por otro lado requiere un replegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Estos procedimientos dificultan la producción práctica de proteínas recombinantes para uso terapéutico, diagnóstico u otros. Para solventar estos problemas, se han empleado ciertos péptidos o proteínas fusionados a las proteínas heterólogas. Sin embargo, la iniciación de la traducción es muy sensible a la secuencia nucleotídica que rodea al codón de iniciación de la proteína heteróloga, por esta razón, la fusión puede afectar a los niveles de expresión de dicha proteína.

En bacterias, la fusión de la proteína de interés con la tiorredoxina de *E. coli* (TrxA) ha demostrado ser especialmente útil evitando la formación de cuerpos de inclusión y aumentando la solubilidad de las proteínas heterólogas (LaVallie et al, 1993). Otros trabajos han demostrado que la TrxA bacteriana es capaz de aumentar la solubilidad de proteínas heterólogas mediante coexpresión de ambas (Yuan et al, 2004).

Pese a los esfuerzos realizados en este campo, todavía no se ha descrito ningún método que permita solubilizar cuerpos de inclusión en sistemas de producción de proteínas heterólogas en cloroplastos.

En la presente invención se describe por primera vez la solubilización de los cuerpos de inclusión cuando se coexpresa Trx m con proteínas heterólogas en cloroplastos de tabaco, lo cual garantizaría la conservación de la conformación nativa de la proteína coexpresada y, por tanto, evitaría la pérdida de actividad funcional. El problema técnico resuelto por la invención en este punto es cómo conseguir un plegamiento en forma activa y una solubilización de la proteína heteróloga que no se acumule en cuerpos de inclusión. Esta solución se encuentra recogida en EP1609867 o en WO9837208. Sin embargo estos documentos se refieren a *E. coli* o levaduras como organismos transformados. Ningún documento del estado de la técnica induce al experto en la materia a modificar el vector de fusión descrito en WO0250289 con una construcción como la descrita en EP1609867 o en WO9837208 y utilizarlo como vector de coexpresión en plastidios para obtener proteínas heterólogas en conformación soluble y activa sin que se acumulen en cuerpos de inclusión como hace la invención. De hecho en EP1609867 tanto la fusión como la coexpresión provoca incremento de la solubilidad, mientras que en plastidios, las construcciones de fusión producen proteínas heterólogas que se acumulan en cuerpos de inclusión, lo cual indica que plastidios y bacterias se comportan en este caso de modo diferente como sistemas de expresión. Por otra parte, la construcción descrita en WO9837208 es muy diferente a la de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vectores de expresión plastidial que incorporan moléculas de ácido nucleico que codifican la tiorredoxina *f* plastidial y su precursor, procedentes de *Nicotiana tabacum*, (SEQ ID N°:1 y 3), que producen los correspondientes polipéptidos (SEQ ID N°: 2 y 4), así como moléculas sustancialmente homólogas a las mismas (porcentaje de homología mínimo del 60%) o sus variantes alélicas.

La invención se refiere también a los organismos hospedadores que los incorporan, particularmente plantas.

Un aspecto adicional de la invención describe el método de obtención de las plantas transgénicas citadas, que comprende la integración de uno de los vectores descritos, por cualquier medio apropiado, en el plastoma de una planta.

También se observó que las plantas transgénicas que incorporaban Trxf en los vectores plastidiales descritos, producían cantidades de almidón y sacarosa superiores en 5 ó 10 veces a las obtenidas de los mismos tejidos u órganos de las plantas silvestres correspondientes, cultivadas en condiciones idénticas. Por tanto, una realización adicional de la invención es el uso de la citada planta transgénica para la obtención de sacarosa y almidón.

En algunos casos, la coexpresión ha producido proteínas heterólogas recombinantes con propiedades diferentes. Así, la invención describe una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante hCT1 obtenida a partir de la planta transgénica que incorpora dicha proteína coexpresada con las Trx de la invención. Esta proteína recombinante muestra una mayor bioactividad que la proteína producida en cloroplastos cuando la hCT1 se expresa sola. Adicionalmente, se describe un método para determinar la bioactividad de dicha hCT1 recombinante.

Los citados vectores y hospedadores recombinantes se han utilizado también para la sobreexpresión de proteínas heterólogas recombinantes en cloroplastos, en forma soluble y activa, cuyas secuencias se han coexpresado con las de la Trx f. Una realización adicional de la invención se refiere a un método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o plegadas en su correcta conformación, a partir de plantas transplastómicas que coexpresan las secuencias de dichas proteínas junto con las de la Trx f.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vectores de expresión plastidial que incorporan moléculas de ácido nucleico que codifican la tiorredoxina *f* plastidial y su precursor, procedentes de *Nicotiana tabacum*, (SEQ ID N°:1 y 3), que producen los correspondientes polipéptidos (SEQ ID N°: 2 y 4), así como moléculas sustancialmente homólogas a las mismas (porcentaje de homología mínimo del 60%) o sus variantes alélicas (véase Fig. 1).

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen las moléculas de ADN que codifican Trx *f*. La integración en el genoma plastidial se realizó mediante secuencias de recombinación homóloga ZRI y ZRD (Fig. 4) por lo que una realización adicional de la invención está constituida por los vectores plastidiales que incluyen dichas secuencias. En el caso de la SEQ ID N°:3, hubo que añadir un codón de iniciación ATG, correspondiente a metionina, en posición 5', para la iniciación de la traducción.

Para optimizar la síntesis de Trx en cloroplastos es necesario considerar otros elementos. El nivel final de síntesis proteica depende de varios factores como dosis génica, fuerza del promotor, estabilidad del ARNm y eficiencia de la traducción. Por tanto, en el diseño de los vectores de transformación, la expresión de los transgenes en cloroplastos transgénicos puede ser regulada a tres niveles: (a) transcripcionalmente mediante la elección del promotor; (b) postranscripcionalmente por la elección de la 5'UTR que regula la estabilidad de los ARNm y (c) traduccionalmente, también mediante la elección de la región 5'UTR que dirige el nivel traduccional. Aunque la presencia de la 3'UTR es importante para conferir estabilidad al ARNm, generalmente no hay diferencias traduccionales al cambiar unas regiones 3'UTR por otras. Por ello, no se considera esta región como una variable a modificar en los diferentes vectores. En realizaciones preferidas de la invención se introducen promotores endógenos constitutivos de plastidios para dirigir el gen de interés en la transformación y secuencias inductoras de la traducción (5'UTRs).

Los promotores plastidiales probados para la expresión de proteínas heterólogas hasta el momento han sido varios, pero los mejores niveles de expresión se han obtenido con los promotores *Prrn* y *PpsbA*, ambos dos constitutivos. Se sabe que el *PpsbA* es un promotor muy activo, produciendo uno de los ARNms más abundantes en el cloroplasto (Yukawa et al, 2007). Los resultados de varios estudios en cuanto a la fuerza de los promotores son ambiguos, decantándose unos hacia el *Prrn* y otros hacia el *PpsbA* (Farran et al, 2008).

Para la elección de regiones 5'UTR se disponía de varias opciones. Una de las regiones más interesantes era la 5'UTR del gen *psbA* de tabaco, que había sido utilizada originalmente para estudios funcionales con GUS y se sabía que era, entre varias, la que más inducía la traducción en condiciones de luz y confería gran estabilidad a los transcritos (Eibl et al, 1999). Se han alcanzado, en plastidios de tabaco, niveles de expresión del 31,1% de proteína soluble total (Molina et al, 2004) utilizando dicha 5'UTR. Otro elemento de interés era el sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L). Este RBS es complementario al anti-RBS de la 16SrRNA, que proporciona señales de traducción muy eficientes e independientes de la luz. Además, ya se había comprobado que aumentaba la capacidad de traducción de genes exógenos en *E.coli* (Olins et al, 1988) y plastidios (Staub et al, 2000), llegando a alcanzar niveles de expresión del 25% de proteína soluble total (Tregoning et al, 2003). Como resultado del estudio de los promotores y regiones 5'UTR disponibles, se decidió elegir los siguientes elementos: promotor *Prrn* con su propia 5'UTR, promotor *Prrn* y RBS del gen *10* del bacteriófago T7 (G10L), y promotor y 5'UTR del gen *psbA*. Por todo ello, los vectores de la invención incorporan el inserto unido operativamente al promotor y el 5'UTR del gen *psbA* de *N. tabacum*. Asimismo, el inserto se une al promotor *Prrn* y al RBS de G10L.

El vector utilizado para la sobreexpresión de Trx *f* mediante transformación plastidial fue el pL3 que ha sido probado para la expresión de cardiotrofina-1 humana, hCT1 (Farran et al, 2008). Este vector integra los genes de interés por recombinación homóloga dentro de los marcos de lectura abiertos (ORFs) 70 y 131 situados entre los genes *rrn16/trnV* y *rps7/12*, en la zona repetida invertida del genoma plastidial. La inserción en esta zona ya ha sido usada anteriormente (Maliga, 2004), y permite integrar los genes sin interferir con regiones codificantes y sin consecuencias fenotípicas. La integración de los genes de interés se produce dentro de la región duplicada invertida, por lo que cada plastoma contendrá dos copias de los genes de interés como resultado del proceso de corrección de copia de los plastidios (Maliga, 2004), resultando en un altísimo número de transgenes por célula (hasta 20.000). Consecuentemente, se prefieren las realizaciones de la invención referidas a vectores derivados de pL3. Las construcciones finalmente analizadas para estudiar la sobreexpresión de la Trx *f* en plastidios de tabaco fueron: pL3psbATTRXf, pL3PrrnTRXf y pL3PrrnG10LTRXf (Fig. 2). De ellas, las que proporcionaron mejores resultados para la sobreexpresión de Trx fueron la primera y la última.

La presente invención se aplica además a la producción de proteínas heterólogas coexpresadas con trx *f* en un organismo huésped no nativo. En los vectores de coexpresión las dos proteínas, Trx y proteína heteróloga, se han expresado en forma libre, dirigidas por un promotor diferente con el fin de evitar una posible recombinación entre las secuencias de dichos promotores que supusiera una delección de uno de los transgenes. Los vectores de coexpresión que comprenden las secuencias de Trx (SEQ ID N°: 1 o codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:3) unidas al promotor constitutivo endógeno plastidial *Prrn* y a la secuencia inductora de la traducción RBS, independientes del promotor y la secuencia inductora de la traducción 5' UTR del gen *psbA* de *N. tabacum*, unidos operativamente a la proteína heteróloga. Los vectores que coexpresan la albúmina sérica humana corresponden a

una realización preferida, y se prefiere especialmente la utilización del plásmido pAF, siendo el vector preferido pAFpsbABHSA::PrnG10LTRXf. La otra proteína coexpresada con Trx fue la hCT1, constituyendo su vector de coexpresión otra realización preferida, especialmente aquél que incluye como plásmido el pL3, en concreto el vector más preferido es pL3PrnG10LTRXf::psbAhCT1.

5 Las siguientes realizaciones de la invención se refieren a organismos hospedadores que incorporan los diferentes vectores plastidiales de coexpresión detallados anteriormente. Dichos hospedadores pueden ser plantas transgénicas, sus semillas o material de propagación, que incorporan en sus plastidios los vectores recombinantes descritos. En realizaciones preferidas, se describen sucesivamente las plantas transgénicas que incluyen los vectores de coexpresión descritos anteriormente, preferiblemente dichas plantas pertenecen a las especies

10 *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum*.

Una realización adicional de la invención describe métodos de obtención de las nuevas plantas transgénicas descritas, que permiten integrar en su plastoma los vectores recombinantes descritos anteriormente. Un método preferido, incluye las siguientes etapas:

15 a) bombardeo de hojas cultivadas *in vitro* con una pistola de genes cargada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 48;

b) obtención de los primeros transformantes regenerados en medio de cultivo suplementado con un antibiótico frente al cual confiera resistencia el vector bombardeado;

c) realización de, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo con el mismo antibiótico, para obtener plantas homoplásmicas;

20 d) selección de las plantas homoplásmicas mediante cualquier método de selección de ADN por tamaños.

Se prefieren aquellos métodos en los que las hojas proceden de las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum* y el antibiótico utilizado es espectinomicina.

25 En realizaciones adicionales, se describen los diversos usos para los que se emplearon los hospedadores y, sobre todo, las plantas transgénicas descritas.

Las plantas que producen mayores niveles de Trx f (PrnG10LTRXf y PpsbATRXf) en el cloroplasto muestran una acumulación de almidón en hojas, considerablemente superior a la obtenida en las plantas control (Fig. 7). Además, en las hojas de estas plantas transplastómicas, no se produce una degradación nocturna del almidón, indicando que el proceso de la glucólisis podría estar también afectado. La G6PDH cataliza el primer

30 paso del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, y por tanto está involucrada en el catabolismo de los azúcares. Esta enzima es activa por la noche y se inactiva en presencia de luz por acción de las tioredoxinas (Wenderoth et al, 1997; Wendt et al, 2000), por lo que cabría pensar que las células de las hojas de plantas que sobreexpresan la Trx f presentan un poder reductor tan elevado que la G6PDH permanece inactiva incluso durante el periodo de oscuridad, explicando así los altos niveles de almidón que presentan las hojas de dichas plantas. También se

35 puede observar que las plantas transgénicas construídas usando el control transcripcional del promotor Prn, que produce muy bajos niveles de Trx f (Fig. 5, no se detectaron por inmunodetección) tienen un comportamiento muy parecido a las plantas control en cuanto a cantidad de almidón acumulado en hoja, lo que podría explicar la ausencia de una respuesta fisiológica.

Otra diferencia significativa entre la plantas control y las transplastómicas radica en la sacarosa que

40 presentan las hojas de estas últimas, siendo más del doble que la de las plantas control en todos los momentos muestreados (Fig. 7). Esto podría facilitar una mayor exportación de este disacárido hacia los órganos de reserva. Así, plantas de patata o cereal que sobreexpresaran la Trx f en sus plastidios, potencialmente podrían acumular más almidón en sus tejidos de reserva (tubérculos o semillas). De todo ello se desprende el elevado interés

45 industrial de estas plantas en cuanto a la obtención de almidón. Los efectos en cuanto a incremento de sacarosa y almidón se describen en el Ejemplo 5. Consecuentemente con estos hechos, una realización adicional de la invención está relacionada con el uso de las plantas transgénicas que producen niveles incrementados de Trx f para la obtención de sacarosa y almidón. Preferiblemente, dichas plantas producen entre 5 y 10 veces más cantidades de sacarosa y almidón que las obtenidas de los mismos tejidos u órganos de las correspondientes plantas silvestres cultivadas en las mismas condiciones. La obtención de dicho almidón se realizó a través de las

50 siguientes etapas:

a) recogida de hojas y congelación en nitrógeno líquido;

b) pulverización;

c) homogeneización con etanol;

d) incubación durante 90 min a 70°C;

- e) centrifugación durante 10 min a 14000 rpm.
- d) obtención del almidón a partir del pellet obtenido.

Otro aspecto de la invención radica en el análisis de los efectos producidos en las plantas que incluyen las proteínas HSA o hCT1, fusionadas o coexpresadas en sus cloroplastos con las nuevas Trx. En primer lugar, se analizaron las cantidades de HSA acumuladas en hojas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las que se extrajo la proteína total (Farran et al, 2002). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un anti-HSA, se comprobó que las plantas que expresaban la HSA fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas presentaba un patrón de bandas (Fig. 14a, calles 2-4) similar al observado en las muestras de plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14a, calle 1; Fernández-San Millán et al, 2003). Se puede observar una gran cantidad de agregados de alto peso molecular, lo que podría estar indicando la acumulación en el cloroplasto, de la proteína de fusión en cuerpos de inclusión, tal y como ocurre cuando la HSA se expresa sola (Fernández-San Millán et al, 2003). Sin embargo, estos agregados desaparecen cuando la albúmina es co-expresada con alguna de las tiorredoxinas (Fig. 14a, calles 5-7), sugiriendo un posible papel de las Trx en la solubilización de los cuerpos de inclusión de HSA. Además, parece que la expresión de la tiorredoxina en forma libre o fusionada tiene diferente modo de acción sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes (Yuan et al, 2004), lo que explicaría el hecho de que sólo se consiga la disolución de los agregados cuando se coexpresan ambas proteínas. Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas, por otro lado requiere un repliegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Por ello, en muchos casos puede resultar interesante disponer de un sistema de solubilización para la expresión de proteínas heterólogas en los cloroplastos

Dada la gran cantidad de proteína recombinante observada en la inmunodetección de las plantas que expresan la fusión de las Trx con la HSA, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE (Fig. 14b). En los extractos de las hojas que expresan la fusión de las Trx con la HSA, además de la banda correspondiente a la subunidad grande de la RuBisCo (aprox. 50 kDa), se observa una intensa banda teñida con CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) de un tamaño aproximado de 80 kDa (Fig. 14b, calles 1-4). Dicha banda no aparece en los extractos de hoja de las plantas sin transformar (Fig. 14b, PH) ni en los de las plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14b, calle 5). En estos últimos sin embargo, se puede visualizar una banda más tenue, de unos 67 kDa, correspondiente a la HSA. Estos resultados indican que se acumula una gran cantidad de proteína de fusión Trxm/fHSA en los cloroplastos de tabaco, incluso a niveles superiores a los máximos obtenidos en las plantas que expresan la HSA sola ($\approx 11\%$ de la proteína total; Fernández-San Millán et al, 2003). Se sabe que la subunidad grande de la RuBisCo representa aproximadamente el 50% de la proteína soluble total de la hoja (Whitney et al, 1999). Si comparamos la intensidad de la banda de 80 kDa, correspondiente a la proteína de fusión, con la de la subunidad grande de la RuBisCo, podríamos estimar unos niveles de expresión de la Trxm/fHSA entre un 15-20% de la proteína soluble total.

También se analizaron las cantidades de hCT1 acumuladas en hojas completamente desarrolladas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las cuales se extrajo la proteína total (Farran et al, 2002). Estudios preliminares sobre la expresión de hCT1 en cloroplastos de tabaco demostraron que la rhCT1 (hCT1 recombinante) se acumulaba a altos niveles ($\approx 3\%$ de la proteína soluble total) en hojas jóvenes, y se conseguía duplicar estos niveles sometiendo a las plantas a 30 horas de luz continua (Farran et al, 2008). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un monoclonal frente a hCT1, se comprobó que las plantas que expresaban la hCT1 fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas (Trxm/fCT1) presentaban mayores niveles de rhCT1 que las plantas control (CT1; Farran et al, 2008), independientemente de la condición lumínica utilizada (Fig. 15). Por ello, podemos concluir que la fusión de cualquiera de las Trx con la hCT1 proporciona una mayor estabilidad a la proteína de interés, que se traduce en una mayor acumulación de la misma incluso en hojas maduras y sin necesidad de someter a las plantas a condiciones de luz continua. Sin embargo, cuando se analizaron las plantas que coexpresan la Trxm/f con la hCT1 (Trxm/f+hCT1) se vio que los niveles de expresión de hCT1 fueron similares a los obtenidos en las plantas control (Fig. 15). Además, no se observaron incrementos de proteína en condiciones de luz continua (30 h luz), sugiriendo algún efecto de la coexpresión de las Trx sobre el estado redox del cloroplasto, que afecta de algún modo a la traducción de la 5'UTR del *psbA*.

Para estudiar la funcionalidad de la rhCT1 producida en cloroplastos de tabaco, se estudió su capacidad para inducir la fosforilación del factor de transcripción STAT-3. El ensayo se llevó a cabo en la línea HepG2 de hepatocarcinoma humano. Los extractos de las células estimuladas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3 (Fig. 16). Como control negativo se utilizó extracto proteico de tabaco sin transformar y como positivo se utilizó hCT1 comercial (PrepoTech) sola o añadida al extracto crudo de tabaco sin transformar (Fig. 16a). Cuando el bioensayo se realizó con la rhCT1 obtenida a partir de las distintas plantas transformadas, se vio que ésta era capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 independientemente del extracto de planta utilizado (Fig. 16b). Sin embargo, dicha fosforilación fue mucho más intensa en el caso de las células estimuladas con extracto de plantas que expresaban la CT1 fusionada o coexpresada con cualquiera de las tiorredoxinas cloroplásticas probadas, sugiriendo que las tiorredoxinas pueden jugar un papel importante en mejorar la bioactividad de la rhCT1 producida en cloroplastos de hojas de tabaco.

La determinación de la actividad diferencial de la hCT1 recombinante obtenida de las plantas transgénicas, respecto a la comercial, se realizó mediante un método que incluía las siguientes etapas:

a) estimular hepatocitos con cardiotrofina-1 humana recombinante, procedente de la citada planta transgénica y con cardiotrofina-1 humana comercial;

5 b) analizar los extractos celulares estimulados con cada tipo de hCT1 con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3;

c) comparar los resultados de ambos tipos de extracto, utilizando como control negativo extracto proteico de tabaco sin transformar, y como control positivo hCT1 comercial, sola o añadida al extracto sin transformar.

10 Por tanto, un uso contemplado en la invención se refiere a la utilización de las plantas transgénicas descritas que coexpresan hCT1, para obtener una proteína heteróloga cardiotrofina-1 humana recombinante de bioactividad incrementada en al menos el doble respecto a la proteína hCT1 producida en cloroplastos cuando ésta se expresa sola.

15 Dada la elevada actividad de la proteína hCT1 recombinante obtenida a partir de la planta transgénica que incluye el vector de coexpresión descrito (pL3PrnG10LTRXf:psbAhCT1), se establece una realización de la invención referente a una composición farmacéutica que incorpora dicha proteína recombinante, junto con un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Una realización adicional de la invención considera el uso de las plantas transgénicas que incorporan los vectores plastidiales descritos en detalle anteriormente, que contienen las nuevas Trx o sus precursores coexpresados con proteínas heterólogas, para la producción de cantidades incrementadas de dichas proteínas heterólogas, preferiblemente HSA o hCT1, que se obtienen además en forma soluble y activa.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o en su conformación nativa que emplea las plantas descritas anteriormente, que comprende:

25 a) cultivar las plantas transgénicas descritas, que coexpresan la Trx *f* de la invención y proteínas heterólogas, en condiciones apropiadas para su crecimiento;

b) separar las partes verdes de la planta;

c) purificar la proteína heteróloga utilizando técnicas de cromatografía de afinidad, de separación por tamaños con un patrón o de intercambio iónico.

30 En una realización preferida, se describe la aplicación de dicho método para la producción de HSA.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Secuencias nucleotídicas de las tioredoxinas cloroplásticas *f* (a) y *m* (b) de tabaco. En cursiva, secuencia del precursor o péptido de tránsito; triplete subrayado indica el inicio de la proteína madura. Secuencias proteicas de las tioredoxinas cloroplásticas *f* (c) y *m* (d) de tabaco: aminoácidos subrayados indican la secuencia proteica correspondiente al precursor o péptido de tránsito; *parada de la traducción.

Fig. 2. Vectores de sobreexpresión de Trx en plastidio. Se describen las zonas del vector que quedan insertadas en el genoma plastidial. En los extremos aparecen las dos zonas de recombinación homóloga que incluye el vector (ZRI y ZRD). Entre las zonas de recombinación homóloga están esquematizados los diferentes transgenes Trx *m/f* y *aadA* (gen de adenilil-transferasa, para inactivación de antibióticos). En la posición 5' de los transgenes se muestran los promotores y regiones 5'UTR elegidas. **Prn**: promotor de la 16SrARN de tabaco; **PpsbA5'UTR**: promotor y 5'UTR del gen *psbA* de tabaco; **PrnG10L**: promotor de la 16SrARN y región líder del gen 10 del bacteriófago T7. En la región 3' de la Trx *m/f* se encuentra el terminador Trps16 de la proteína ribosómica 16. En la región 3' de *aadA* se encuentra el terminador TpsbANT del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

Fig. 3. Análisis por PCR de la correcta integración de los transgenes en plantas regeneradas tras el bombardeo con pistola de genes. El ADN genómico se extrajo a partir de plántulas *in vitro*. La PCR se realizó con los primers L1 y L2 para comprobar la inserción en el genoma plastidial. El fragmento obtenido en caso de integración es de 1.516 pb. Calles: **M**, Marcador de pesos moleculares; **WT**, ADN de planta control sin transformar; (a) 1-6, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3psbATRXf; (a) 7-10, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3PrnG10LTRXf; (b) 1-3, ADN de plantas regeneradas a partir del bombardeo con el vector pL3PrnTRXf.

Fig. 4. Análisis de la integración de las Trx *f* y *m* en el plastoma y selección de plantas homoplásmicas mediante transferencia de Southern. Se digirieron 10 µg de ADN genómico obtenido a partir de

plántulas *in vitro* con *Bg*II. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,7%. Tras su depurinación se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron con sondas específicas. **(a)** Esquema de la zona de inserción de los transgenes en el genoma plastidial con los sitios de restricción *Bg*II. Las regiones de recombinación homóloga aparecen subrayadas y se indican como ZRD y ZRI. También se muestran los diferentes transgenes que se integran con los vectores de transformación y a su derecha el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del ADN con *Bg*II. SH: sonda homóloga a las zonas adyacentes a los transgenes insertados en el genoma plastidial. ORF: marcos de lectura abiertos. LOX: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE del fago P1; rps: proteína ribosómica; trnV: gen del ARN de transferencia de la valina. **(b)** Autorradiografía del Southern. Calles: **PH**, ADN de una línea Petit Havana sin transformar como control negativo; **1-3**, ADN de líneas transgénicas generadas por la transformación con el vector pL3psbATRXm/f; **4-6**, pL3PrnTRXm/f; **7-9**, pL3PrnG10LTRXm/f.

Fig. 5. Inmunodetección de proteínas de hojas de plantas transgénicas de tabaco. Extractos de proteína total se separaron en un gel SDS-PAGE al 13% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidine* conjugado con peroxidasa. Calles: **M**, marcador de pesos moleculares en kDa; **PH**, 2 µl de proteína de planta Petit Havana sin transformar; el resto de calles son proteína de hojas de plantas transformadas con los vectores **1-3**, pL3psbATRXF (2 µl/pocillo); **4-7**, pL3PrnG10LTRXf (2 µl/pocillo); **8-11**, pL3PrnTRXf (5 µl/pocillo).

Fig. 6. Patrones transcripcionales de las plantas transgénicas observados en transferencia de Northern. 20 µg de ARN obtenidos a partir de hojas maduras de plantas adultas en maceta se separaron en un gel de formaldehído y se transfirieron a membrana de nylon. Se hibridaron con una sonda específica de la Trx f. **(a)** Se muestra con flechas el tamaño esperado del transcrito en las líneas transgénicas generadas por los distintos vectores. ORF: marcos de lectura abiertos. LOX: secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE del fago P1; rps: proteína ribosómica; trnV: gen del ARN de transferencia de la valina. **(b)** Autorradiografía resultante de la hibridación con la sonda de la Trx f. A la derecha se muestran los tamaños del marcador de pesos moleculares de ARN en kb. **(c)** Control de carga: ARNr teñido con bromuro de etidio. Calles: **PH**, ARN de planta Petit Havana sin transformar; el resto son ARNs de plantas transformadas con **1, 2 y 3**, pL3psbATRXf; **4 y 5**, pL3PrnTRXf; **6 y 7**, pL3PrnG10LTRXf.

Fig. 7. Concentración de azúcares solubles y almidón, durante el ciclo diurno, en hojas de plantas transplastómicas y plantas control sin transformar. Las concentraciones de carbohidratos se midieron en hojas jóvenes de plantas adultas de tabaco, cultivadas en invernadero. Se tomaron muestras cada 4 horas, con 12 repeticiones por muestra y construcción. Los datos representan la media y el error estándar. Símbolos: ○, planta control sin transformar; ●, plantas transformadas con el vector pL3PrnTrxf; ■, plantas transformadas con el vector pL3PrnG10LTRxf; ▲, plantas transformadas con el vector pL3PsbATrx.

Fig. 8. Expresión de Trx recombinante en *E. coli*. Se cargaron cantidades iguales de proteína por pocillo en un gel SDS-PAGE al 13% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. **(a)** La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidina* conjugado con peroxidasa, y **(b)** se tiñó con Ponceau S. Calles: **M**, marcador de pesos moleculares; **pL3**, vector pL3 vacío como control negativo; el resto de calles son proteína de *E. coli* transformada con los siguientes vectores: **1 y 2**, pL3 PrnG10LTRX m y f; **3 y 4**, pL3 psbATRX m y f; **5 y 6**, pL3PrnTRX f y m. Se indican los pesos moleculares en kDa.

Fig. 9. Purificación de Trx recombinante en *E. coli*. Se cargaron cantidades iguales de cada fracción obtenida en el proceso de purificación en un gel SDS-PAGE al 15% que se tiñó con coomassie brilliant blue **(a)** o se transfirió a membrana de nitrocelulosa **(b)**. La membrana se hibridó con un anticuerpo monoclonal *anti-poliHistidina* conjugado con peroxidasa. Calles: **M**, marcador de pesos moleculares; **FT**, fracción de proteínas no retenida por la columna; **W**, lavado; **E1 a E4**, fracciones de 1 ml eluidas. Se indican los pesos moleculares en kDa.

Fig. 10. Reducción Trx-dependiente de la insulina por acción de ditiotreitól. Las mezclas incubadas contenían en un volumen final de 600 µl: 0,1M fosfato potásico (pH 7,0), 2 mM EDTA, 0,13 mM insulina bovina y 0,33 mM DTT (ditiotreitól). Símbolos: ●, 5 mM de Trx de *E.coli* comercial, ○, 5 mM de Trx f. Se muestra la absorbancia a 650nm frente al tiempo en minutos.

Fig. 11. Clonación de los vectores de fusión y coexpresión de tiorredoxinas y albúmina sérica humana en el plásmido pAF. **(a-d)** Casetes de expresión de la fusión de las tiorredoxinas (TRX) a la albúmina sérica humana (HSA) (a y b) o de coexpresión de las TRX con la HSA (c y d) que se insertan en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pAF. **16S/trnI y trnA/23S**: zonas de recombinación homóloga; **aadA** gen de resistencia a espectinomicina y estreptomycin; **3'psbA**: región 3' no traducida terminadora del gen psbA de tabaco; **Prn**: promotor del operón 16SrARN; **PpsbA5'UTR**: promotor y región 5' no traducida del gen psbA de tabaco; **PrnG10L**: promotor del operón 16SrARN más la secuencia del sitio de unión al ribosoma (rbs) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L). **EK**: Secuencia de reconocimiento para corte con enteroquinasa. EcoRV, HindIII, SmaI, NotI, EcoRI: sitios de corte de enzimas de restricción. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción.

Fig. 12. Clonación de los vectores de fusión y coexpresión de tioredoxinas y cardiotrofina-1 humana en el plásmido pL3. (a-d) Casetes de expresión de la fusión de las tioredoxinas (TRX) a la cardiotrofina-1 humana (hCT1) (a y b) o de coexpresión de las TRX con la hCT1 (c y d) que se insertan en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pL3. **ZRD y ZRI:** zonas de recombinación homóloga; **aadA** gen de resistencia a espectinomomicina y estreptomomicina; **TpsbANT:** terminador del gen *psbA* de *Nicotiana tabacum*; **Trps16:** terminador de la proteína ribosómica 16; **LOX:** secuencia de reconocimiento de la recombinasa CRE; **Prn:** promotor del operón *16SrARN*; **PpsbA5'UTR:** promotor y región 5' no traducida del gen *psbA* de tabaco; **PrnG10L:** promotor del operón *16SrARN* más la secuencia del sitio de unión al ribosoma (rbs) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L). **EK:** Secuencia de reconocimiento para corte con enteroquinasa. EcoRV, HindIII, SmaI, NotI, EcoR1: sitios de corte de enzimas de restricción. Mediante flechas se indica el sentido de la transcripción.

Fig. 13. Análisis de la integración de las fusiones y coexpresiones de Trx con proteínas heterólogas en el plastoma y selección de plantas homoplásmicas mediante transferencia de Southern. Se digirieron 10 µg de ADN genómico obtenido a partir de plántulas *in vitro* con *Bgl*III (pL3) o *Hind*III (pAF). Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,7%. Tras su depuración se transfirieron a membrana de nylon y se hibridaron con sondas homólogas a las zonas adyacentes a los transgenes insertados en el genoma plastidial. (a-d) Autorradiografías del Southern. **PH,** ADN de una línea Petit Havana sin transformar como control negativo. **Resto de calles,** ADN de líneas transgénicas generadas por la transformación con el vector pAFTRXm/fHSA (a); pL3TRXm/fCT1 (b); pAFTRXm/f + HSA (c); pL3TRXm/f + CT1 (d). TRXm/f: tioredoxinas *m* ó *f*; HSA: albúmina sérica humana; CT1: cardiotrofina-1.

Fig. 14. Producción de albúmina humana recombinante en plantas de tabaco. (a) Inmunodetección de la proteína total extraída a partir de hojas de plantas transgénicas de tabaco. Se ha utilizado un anticuerpo policlonal frente a albúmina sérica humana (HSA). Calles: **1,** plantas que expresan la HSA sola (Fernández-San Millán et al, 2003); **2-4,** plantas que expresan la proteína de fusión Trxm/fHSA; **5-7,** plantas que coexpresan las proteínas Trxm/f y HSA; **PH,** planta no transformada. (b) gel SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue (CBB). Calles: **PH,** planta no transformada; **M,** marcador de peso molecular en kDa; **1-2,** plantas que expresan la proteína de fusión TrxmHSA; **3-4,** plantas que expresan la proteína de fusión TrxfHSA; **5,** plantas que expresan la HSA sola (Fernández-San Millán et al, 2003). Trx *m/f*: tioredoxina *m* ó *f*.

Fig. 15. Análisis de la acumulación de cardiotrofina-1 humana recombinante tras distintos periodos de iluminación. Inmunodetección de la proteína total extraída a partir de hojas de plantas transgénicas de tabaco. Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal frente a cardiotrofina-1 humana recombinante (rhCT1). Se han utilizado hojas maduras cosechadas tras 15 horas de oscuridad o a las 12 y 30 horas de luz continua. Calles: **M,** marcador de peso molecular (kDa). **CT-1:** plantas que expresan la cardiotrofina-1 humana sola (Farran et al, 2008). **OSC:** oscuridad; **12L:** 12 h de luz continua; **30L:** 30 h de luz continua.

Fig. 16. Ensayo de la actividad de la rhCT1 a través del análisis de la activación de la fosforilación de STAT-3. Inmunodetección con anticuerpo específico para la forma fosforilada de STAT-3. (a y b) Calles: **hCT-1,** control positivo de células estimuladas con CT-1 humana comercial; **C,** control negativo de células sin estimular. (a) Calles: **extracto wt,** control negativo de células estimuladas con extracto de plantas no transformadas; **hCT-1 en extracto wt,** control positivo de células estimuladas con extracto de plantas no transformadas al que se le ha añadido CT-1 humana comercial. (b) Calles: **CT1,** células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la CT1 sola; **Trxm/fCT1,** células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la fusión Trxm/fCT1; **Trxm/f+CT1,** células estimuladas con distintas cantidades de extracto de plantas transformadas con la CT1 coexpresada con la Trxm/f.

EJEMPLOS

-Ejemplo 1.- Obtención de las secuencias maduras de las Trx plastidiales *m* y *f*.

Se obtuvieron las secuencias de las Trx maduras *m* y *f* de *Nicotiana tabacum* aún no descritas, mediante amplificación de sus extremos 5' y 3'. Para ello se utilizó el *Kit RLM-RACE* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante y diseñando cebadores internos a partir de las regiones conservadas en Trx de solanáceas (TxfRACEup, TxfRACEdown, TxmRACEup, TxmRACEdown; Tabla 1). Como molde se utilizó cDNA de tabaco var. Petit Havana. Basándose en las secuencias amplificadas mediante RACE se diseñaron los cebadores NtTrxm-5', NtTrxm-3', NtTrxf-5' y NtTrxf-3' (Tabla 1) para clonar las Trx maduras *m* y *f* de tabaco (SEQ ID N° 3 y 7; véase también Fig.1). Estos cebadores incorporan en la región 5' la diana *Nco*I para la fusión con el extremo 3' del promotor correspondiente seguida de una cola de histidinas, y en la región 3' una diana *Not*I.

Tabla 1 Cebadores utilizados en la clonación de las secuencias de las Trx maduras *m* y *f* de tabaco.

Cebadores	Secuencia ¹	Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción
TxfRACEup	GTTGCAATCAAGCTTCAGAAAGAC	
TxfRACEdown	GTCTTTCTGAAGCTTGATTGCAAC	
TxmRACEup	GAGGGGCTTTCATCTGTATTGAG	
TxmRACEdown	CTGAATACAGATGAAAGCCCCTC	
NtTrxm-5' ²	<u>CCATGGG</u> TCACCATCACCATCACCATGAAGCGCAA	<i>NcoI</i>
NtTrxm-3'	<u>GCGGCCG</u> CTTACAAGAATTTCTCTATGCAGGTGG	<i>NotI</i>
NtTrxf-5' ²	<u>CCATGGG</u> TCACCATCACCATCACCATAGCTCCGATGCT ACTG	<i>NcoI</i>
NtTrxf-3'	<u>GCGGCCG</u> CTTAAGTTGACCGCACATCCTCAATTG	<i>NotI</i>

¹Secuencia del cebador en orientación 5'→3'.²En cursiva: cola de histidinas.**-Ejemplo 2.- Obtención de vectores de expresión de tiorredoxinas.**

5 pL3psbATRXm/f: las secuencias maduras de las Trx *m* y *f* se obtuvieron por digestión *NcoI-NotI* de los vectores pGEMTRXm y pGEMTRXf, resultando un fragmento de 366 y 390 pb respectivamente. Estos fragmentos se clonaron en el vector pBS-psbA_{HS}A (Fernández-San Millán et al, 2003), digerido con *NcoI-NotI*, para incorporar el promotor y la 5'UTR del gen *psbA* de tabaco. El promotor y la 5'UTR del gen *psbA* junto con las Trx *m* o *f* se subclonaron, mediante digestión *EcoRI-NotI*, en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1psbATRXm/f). Finalmente, el

10 fragmento *EcoRI-XhoI* de dichos vectores se insertó en el vector de transformación plastidial pL3, para obtener así los vectores finales pL3psbATRXm y pL3psbATRXf (véase Fig. 2)

pL3PrnTRXm/f: el fragmento de 215 pb perteneciente al promotor del operón del RNA ribosomal del plastidio (Prn) se obtuvo del vector pBS-PrnaadA (del Río, resultados no publicados). En este vector se clonó el fragmento *NcoI-NotI* de la Trx *m* o *f*. Por digestión *EcoRI-NotI* de los vectores intermedios obtenidos (pBS-KSPrnTRXm/f) se obtuvo la fusión de la Trx *m* o *f* con el promotor del operón rRNA, que se clonó en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1PrnTRXm/f). Finalmente, el fragmento *EcoRI-XhoI* de dichos vectores se insertó en el vector de transformación plastidial pL3, para obtener así los vectores finales pL3PrnTRXm y pL3PrnTRXf (véase Fig. 2)

pL3PrnG10LTRXm/f: el fragmento *NcoI-NotI* correspondiente a la secuencia madura de las Trx *m* o *f* se introdujo en el vector pBS-PrnG10LCTF (Farran et al, 2008). De esta forma se obtuvieron los vectores pBS-PrnG10LTRXm/f, que por digestión *EcoRI-SalI* liberaron la fusión de las Trx *m* o *f* con el fragmento de 150 pb que incluye el promotor constitutivo del operón del RNA ribosomal del plastidio (*Prm*), al que se le ha sustituido la 5'UTR por la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L). Los fragmentos obtenidos se ligaron con el vector pL3 para dar lugar a los vectores de transformación plastidial pL3PrnG10LTRXm y pL3PrnG10LTRXf (véase Fig. 2)

-Ejemplo 3.- Generación de plantas transgénicas.

La transformación plastidial se basó en el protocolo de Daniell (1997) con ligeras modificaciones que se comentan a continuación. Se partió de hojas de tabaco *in vitro* obtenidas tras una micropropagación después de la germinación. Una hora antes del bombardeo se cortaron las hojas de tabaco, descartando las apicales y las basales. Se pusieron sobre un papel de filtro estéril en medio RMOP (sales MS, 30 g/l sacarosa, 0,1 mg/l ANA, 1

30 mg/l BAP, 100 mg/l mio-inositol, 1 mg/l tiamina y 6 g/l Phytagar pH 5,8) en placas Petri con el envés hacia arriba. Se utilizaron partículas de oro de 0,6 micras a razón de 100 ng de oro y 300 ng de ADN por hoja bombardeada. La presión de ruptura fue de 1.100 psi. Todo el material fungible utilizado fue de Bio-Rad. Tras el bombardeo con la pistola de genes Helios Gene Gun PDS-1000 (Bio-Rad), se mantuvieron las hojas en oscuridad durante 48 h dentro de las placas Petri selladas con parafilm. Tras este período, se cortaron las hojas en trozos de unos 0,5 cm de lado descartando el nervio central. Los trozos de hoja se pusieron con el envés (parte bombardeada) en contacto con el medio RMOP suplementado con 500 mg/l de espectinomicina en cajas Magenta selladas con parafilm. Los primeros transformantes empezaron a emerger de los trozos de hoja a las 3-4 semanas del bombardeo. Los brotes así obtenidos se dejaron crecer hasta que tuvieron suficiente tamaño para extraer el ADN y comprobar la integración de la Trx y el aadA por PCR. Los cebadores utilizados L1 (5'-GGAAATACAAAAGGGGG-3') y L2 (5'-CCTCGTTCAATTCTTTTCG-3') fueron diseñados para eliminar posibles mutantes resistentes a espectinomicina. El

40

cebador L1 anilla en el *Trps16*, a unas 131 pb del final del mismo, y el cebador L2 anilla en el genoma plastidial, a unas 223 pb tras la ZRD. De esta forma, si se ha producido integración de los genes de interés, el producto esperado debe ser de 1,5 kb (Fig. 3a, calles 4-9 y 3b, calles 1-3). La ausencia del producto de PCR indica que esos regenerantes son mutantes espontáneos capaces de crecer en espectinomicina sin presencia del gen *aadA*. Como se puede observar en la Fig. 3, aparecieron mutantes entre los regenerantes muestreados (calles 1-3 y 10). Una alta incidencia de regenerantes resistentes a espectinomicina como resultado de una mutación en el gen 16S rARN plastidial ha sido demostrada en varias ocasiones.

La obtención de líneas transformadas estables implica el cultivo de los transformantes en presencia de espectinomicina durante el tiempo necesario para que las células se dividan, al menos, entre 16 y 17 veces. Durante este tiempo los plastidios transformados tienen ventaja selectiva sobre los no transformados, aumentando en número gradualmente. Los primeros regenerantes obtenidos suelen ser totalmente verdes pero quiméricos, con sectores transformados y sin transformar debido al enmascaramiento por el tejido transgénico. Por ello es necesario, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo para obtener plantas homoplásmicas. Así, las hojas de los brotes transformados se cortaron en trozos de unos 3 mm de lado y se sometieron a dos o tres nuevas rondas de regeneración en medio RMOP con 500 mg/l de espectinomicina hasta conseguir la homoplasma. Cuando las nuevas plantas regeneradas estuvieron enraizadas, se procedió al análisis mediante transferencia de Southern. Utilizando una sonda a partir de un fragmento de las zonas de recombinación homóloga (sonda SH, ver Fig. 4a) se puede confirmar una integración específica y estable de los transgenes dentro de las regiones duplicadas invertidas del plastoma y seleccionar las plantas homoplásmicas. El ADN de plantas transformadas digerido con *Bgl*II e hibridado con la sonda SH debe producir fragmentos de 6,7 o 4,9 y 1,8 kb según el vector empleado (ver Fig. 4a). En el caso de que el genoma esté sin transformar debe aparecer un fragmento de 4,5 kb. La presencia de ambos tipos de bandas indica heteroplasma. Como se puede observar en la Fig. 4b, se obtuvieron plantas homoplásmicas en todas las construcciones.

-Ejemplo 4.- Detección de Trx recombinante en plantas transgénicas de tabaco.

En primer lugar se detectó la presencia de Trx recombinante en plantas transgénicas de tabaco mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-histidina. Se analizó la proteína total de hojas maduras de las plantas transformadas. Como se aprecia en la Fig. 5, en las plantas transformadas con los vectores pL3psbATRXf y pL3PrnG10LTRXf se detectó una banda de 12 kDa correspondiente a la Trx *f*, siendo la expresión en las mismas de magnitud comparable. Sin embargo, en las líneas obtenidas con el vector pL3PrnTRXf no se detectó Trx *f* mediante esta técnica, a pesar de que se cargó en el gel más proteína total que en el resto. Resultados similares se obtuvieron cuando se sobreexpresó la Trx *m*. Las bandas que aparecen por encima de la Trx *f*, de aproximadamente 23, 27 y 40 kDa, se corresponden con proteínas endógenas de la planta que reaccionan con el anticuerpo anti-histidina utilizado, ya que dichas bandas aparecen también en el extracto de planta sin transformar (Fig. 5, calle PH).

Los factores que influyen en el rendimiento de una proteína heteróloga pueden ser transcripcionales, como la actividad del promotor; postranscripcionales, como la estabilidad del ARN mensajero o la eficiencia de la traducción; y postraduccionales, como la estabilidad de la proteína. Puesto que, *a priori*, la estabilidad de la proteína debería ser exactamente igual en todas las plantas obtenidas, se realizaron estudios a nivel de ARN mensajero para elucidar las causas de las diferencias de acumulación de Trx *f* entre líneas transgénicas.

Se extrajo ARN de hojas maduras de las plantas transformadas y se hibridó con una sonda específica de la Trx *f*. Los niveles de transcritos de Trx variaron entre las distintas líneas transgénicas obtenidas (Fig. 6). Se puede observar cómo la línea transformada con pL3PrnTRXf (calles 4 y 5) tiene similar número de transcritos que la línea transformada con pL3PrnG10LTRXf (calles 6 y 7), lo cual era de esperar, ya que las dos se encuentran bajo el control del mismo promotor *Prn*. Sin embargo, cuando la Trx está dirigida por el promotor del gen *psbA* se produce mayor cantidad de transcrito (calles 1, 2 y 3).

En resumen, los vectores que más eficientemente han expresado Trx en cloroplastos transgénicos de tabaco han sido el pL3psbATRXm/f y pL3PrnG10LTRXm/f (Fig. 5). Se ha comprobado que el promotor del gen *psbA* es muy activo en el plastidio, siendo mucho más fuerte que el *Prn* (Fig. 6). Por otra parte, el RBS de la secuencia líder G10L del bacteriófago T7 es un elemento de gran eficacia en la traducción de la Trx, puesto que presentando menos transcritos de Trx *f* que el promotor del *psbA*, los niveles de proteína obtenida son similares (Figuras 5 y 6). Así, se obtienen plantas que sobreexpresan Trx *m* o *f* a diferentes niveles.

-Ejemplo 5.- Efecto de la sobreexpresión de la Trx *f* sobre el metabolismo de los carbohidratos.

Se muestrearon hojas jóvenes de plantas cultivadas en invernadero (fotoperiodo de 15h de luz, con temperaturas de 30/17°C día/noche). Se recogieron muestras cada cuatro horas, durante un período de 24 horas y se guardaron congeladas a -80°C. Los discos de hoja congelados en nitrógeno líquido se pulverizaron con la ayuda de un aparato Microdismembrator (Braun). Se homogeneizaron con 500 µl de etanol al 100% y se añadieron 500 µl de etanol al 80%. Las muestras se incubaron durante 90 min a 70°C, y se centrifugaron (14000 rpm, 10 min). La concentración de azúcares solubles se determinó a partir del sobrenadante mediante cromatografía de alta presión (HPLC) con detección amperométrica, en un sistema DX-500 Dionex ajustado a una columna Carbo-Pac PA1

(Rolletscheck et al, 2002). La concentración de almidón se determinó en el pellet como sigue. El pellet se lavó con 1 ml de etanol 80%, se suspendió nuevamente en 400 µl de KOH 1M, se incubó durante 60 min a 95°C y se neutralizó con 70 µl de ácido acético 1M. La medida del contenido de almidón se realizó siguiendo las indicaciones de un kit comercial (Boehringer Mannheim, Roche), basado en una hidrólisis enzimática y una determinación fotométrica de la cantidad de glucosa. Los resultados obtenidos se reflejan en la Fig. 7. Las plantas que producen mayores niveles de Trx *f* (PrnG10L y PpsbA) en el cloroplasto muestran una acumulación de almidón en hojas entre 5 y 10 veces superior a la obtenida en las plantas control (Fig. 7). Además, en las hojas de estas plantas transplastómicas, no se produce una degradación nocturna del almidón, indicando que el proceso de la glucólisis podría estar también afectado. La G6PDH cataliza el primer paso del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato y, por tanto, está involucrada en el catabolismo de los azúcares. Esta enzima es activa por la noche y se inactiva en presencia de luz por acción de las tioredoxinas (Wenderoth et al, 1997; Wendt et al, 2000). Por ello, cabría pensar que las células de las hojas de plantas que sobreexpresan la Trx *f* presentan un poder reductor tan elevado que la G6PDH permanece inactiva incluso durante el periodo de oscuridad, explicando así los altos niveles de almidón que presentan las hojas de dichas plantas. También se puede observar que las plantas transgénicas construidas usando el control transcripcional del promotor Prn, que produce muy bajos niveles de Trx *f* (Fig. 5, no se detectaron por Inmunodetección), tienen un comportamiento muy parecido a las plantas control en cuanto a cantidad de almidón acumulado en hoja, lo que podría explicar la ausencia de una respuesta fisiológica.

En resumen, la cantidad de almidón detectada en hoja de tabaco transgénico ronda el 6% del peso fresco. En un ensayo de variedades de tabaco hecho en Cadreita y Murieta (Navarra), la variedad control Petit Havana dio unos rendimientos medios de 1,5 t de hojas/ha, valores muy inferiores a los obtenidos con variedades comerciales en las que se podrían obtener hasta 50 t de hojas de tabaco/ha. Esto supondría, en el caso de utilizar variedades productivas, unas 3 toneladas de almidón por ha.

Otra diferencia significativa entre las plantas control y las transplastómicas radica en la sacarosa que presentan las hojas de estas últimas, siendo más del doble que la de las plantas control en todos los momentos muestreados (Fig. 7). Esto podría facilitar una mayor exportación de este disacárido hacia los órganos de reserva. Así, plantas de patata o cereal que sobreexpresaran la Trx *f* en sus plastidios, potencialmente podrían acumular más almidón en sus tejidos de reserva (tubérculos o semillas). De todo ello se desprende el elevado interés industrial de estas plantas en cuanto a la obtención de almidón.

- Ejemplo 6.- Obtención de Trx recombinante soluble y activa en *Escherichia coli*.

Dado que existen grandes similitudes entre la maquinaria de transcripción y traducción de bacterias y plastidios (Brixey et al. 1997), se comprobó la funcionalidad de los vectores diseñados para la transformación plastidial en *E.coli*. Dichos vectores se usaron para transformar la cepa TOP 10F' de *E.coli*. Los transformantes se cultivaron en medio LB Broth con 100 mg/l de espectinomicina durante 20 h a 37°C en agitador orbital, y se analizó la producción de Trx recombinante por inmunodetección con anticuerpo anti-histidina (Fig. 8). Todos los vectores produjeron Trx inmunoreactiva, aunque el vector que produjo más Trx en este modelo fue el pL3PrnG10LTRXm/f, lo cual parece deberse a la presencia del RBS del gen 10 del bacteriófago T7, que es capaz de aumentar la traducción de genes exógenos en *E. coli* (Olins et al. 1988). De este modo, se seleccionaron las cepas con los vectores pL3PrnG10LTRXm/f para continuar con el proceso de purificación.

La purificación de las Trx se llevó a cabo empleando el siguiente procedimiento. Los inóculos se cultivaron en 50 ml de medio TB Broth con 100mg/l de espectinomicina durante 12 h a 37° y en agitación, para luego diluirlos en 1,5 l del mismo medio y dejarlos a 37°C y agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) alcanzó valores alrededor de 2. En ese momento se centrifugaron los cultivos para recoger las células, que se volvieron a suspender en tampón de sonicación (fosfato sódico 50mM, cloruro sódico 300mM, imidazol 25mM, glicerol al 10%, tritón X-100 al 0,5%, inhibidor de proteasas, pH 7,4) y se guardaron congeladas. Las células se sometieron a ultrasonidos y se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se filtraron a través de un filtro de 0,45 micras. Los sobrenadantes clarificados se incubaron con la resina Ni-NTA Agarose de Qiagen durante 2 h a 4°C en rotación. Al cabo de ese tiempo se pasó todo el volumen por una columna de purificación y posteriormente se lavó con tampón de lavado cuya composición fue idéntica al tampón de sonicación pero con una concentración de imidazol 45mM. La proteína se eluyó con el mismo tampón que contenía imidazol 300mM. Las fracciones que contenían la proteína se sometieron directamente a diálisis para eliminar cualquier traza de imidazol y se guardaron congeladas a -20°C. Las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de purificación se analizaron en un gel SDS-PAGE y por inmunodetección con anticuerpo anti-histidinas (Fig. 9). La concentración de la proteína purificada se cuantificó por Bradford utilizando el ensayo "Bio-Rad Protein Assay", obteniéndose aproximadamente 7 mg/l cultivo.

Para comprobar que las Trx recombinantes producidas en *E.coli* mantenían su actividad oxidorreductasa, se probó su capacidad para catalizar la reducción de los puentes disulfuro de la insulina mediante adición de ditiotreitól (DTT) como agente reductor (Holmgren, 1979) (Fig. 10). A la vista de los datos, se confirmó la actividad oxidorreductasa de las Trx recombinantes.

- Ejemplo 7.- Obtención de los plásmidos de fusión y coexpresión de las Trx con proteínas de interés.

Fusión con HSA (pAFpsbATTRXm-EK-HSA y pAFpsbATTRXf-EK-HSA): A la secuencia madura de la Trx *m* se le eliminó el codón TAA de finalización de la traducción mediante PCR, utilizando los cebadores SacII-TRXm-5' y TRXm-SmaI-3' (Tabla 2) sobre el molde pGEMTRXm y se clonó en un pGEMT (pGEMTRXmΔTAA). Para fusionar la Trx *m* al extremo 5' de la HSA, el fragmento *SacII-SmaI* del vector pGEMTRXmΔTAA se introdujo en el vector pGEM-GPGP-EK-HSA (Del Río, resultados no publicados) digerido con dichas enzimas. Este vector intermedio pGEM-TRXm-EK-HSA se abrió con la enzima *HindIII* y se ligó con el fragmento *HindIII* correspondiente al promotor, la 5'UTR del gen *psbA* y el inicio de la TRX *m* obtenido del vector pBS-psbATTRXm (descrito anteriormente). El fragmento *EcoRV-NotI* de este vector (pGEMpsbATTRXm-EK-HSA) se introdujo en el vector pAF para dar lugar al vector pAFpsbATTRXm-EK-HSA (Fig. 11a). La misma estrategia se llevó a cabo para la construcción del vector pAFpsbATTRXf-EK-HSA, pero utilizando los cebadores SacII-TRXf-5' y TRXf-SmaI-3' (Tabla 2) en la PCR de amplificación de la Trx *f* sin el TAA de finalización de la traducción, sobre el molde pGEMTRXf (Fig. 11b).

Coexpresión con HSA (pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXm y pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXf): Mediante digestión *EcoRI-SacI* del vector pBS-PrnG10LTRXm se obtuvo un fragmento con el promotor PrnG10L y la Trx *m*, que se introdujo en el vector pPCR2.1. Este vector intermedio pPCR2.1PrnG10LTRXm se digirió con *NotI* para introducir la fusión en el vector pLDpsbAHSA (Fernández-San Millán et al, 2003), dando lugar al vector pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXm (Fig. 11c). Siguiendo la misma estrategia de clonación, pero partiendo del pBS-PrnG10LTRXf para obtener el fragmento del promotor PrnG10L y la Trx *f*, se obtuvo el vector pAFpsbAHSA::PrnG10LTRXf (Fig. 11d).

Fusión con CT1 (pL3psbATTRXm-EK-CT1 y pL3psbATTRXf-EK-CT1): Mediante digestión *HindIII* del vector PCR2.1psbATTRXm se obtuvo el fragmento con el promotor, la 5'UTR del gen *psbA* y el inicio de la Trx *m*, que se introdujo en el pGEMTRXmΔTAA para dar lugar al pGEMpsbATTRXmΔTAA. El sitio de reconocimiento para corte por enteroquinasa se obtuvo mediante digestión *SmaI-SacII* del vector pGEMCTB-link (Farran, resultados no publicados), y se introdujo en el extremo 3' de la Trx *m* del vector pGEMpsbATTRXmΔTAA, dando lugar al vector pGEMpsbATTRXm-EK. La secuencia madura de la hCT1 se obtuvo por digestión *XbaI-NotI* del vector pGEMCT1 (Farran et al, 2008), y se introdujo en el vector anterior para dar lugar al vector pGEMpsbATTRXm-EK-CT1. Por restricción *EcoRI* de este último vector se extrajo el fragmento completo de fusión de la Trx *m* a la hCT1 y se introdujo en el vector pL3 para dar lugar al vector pL3psbATTRXm-EK-CT1 (Fig. 12a). La estrategia seguida para la construcción del vector pL3psbATTRXf-EK-CT1 fue la misma pero partiendo del vector pGEMTRXfΔTAA (Fig. 12b).

Coexpresión con CT1 (pL3PrnG10LTRXm::psbACT1 y pL3PrnG10LTRXf::psbACT1): El fragmento correspondiente al promotor PrnG10L y la Trx *m* se obtuvo por digestión *EcoRI-SacI* del vector pBS-PrnG10LTRXm, y se introdujo en el vector pPCR2.1 (pPCR2.1PrnG10LTRXm). El fragmento *NotI* de este vector se clonó en el vector pL3psbACT1 (Farran et al, 2008) que expresa la hCT1 bajo el promotor y la 5'UTR del gen *psbA*, para finalmente obtener el vector pL3PrnG10LTRXm::psbACT1 (Fig. 12c). La clonación del vector pL3PrnG10LTRXf::psbACT1 se llevó a cabo de forma similar, excepto que se partió del vector pBs-PrnG10LTRXf (Fig. 12d).

Tabla 2 Cebadores utilizados en la clonación de los vectores de expresión plastidial.

Cebadores	Secuencia ¹	Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción
SacII-TRXm-5'	CCGCGGAAGCTTAAATTCTTCAAGC	SacII
TRXm-SmaI-3'	CCCGGGCAAGAAATTTCTCTATGCAGG	SmaI
SacII-TRXf-5'	CCGCGGAAGCTTGATTGCAACC	SacII
TRXf-SmaI-3'	CCCGGGACTTGACCGCACC	SmaI

¹Secuencia del cebador en orientación 5'→3'.

- Ejemplo 8.- Transformación de tabaco con plásmidos de fusión y coexpresión mediante bombardeo, y selección de las plantas transgénicas.

La transformación plastidial se basó en el protocolo de Daniell (1997) descrito anteriormente. Partiendo de las plántulas *in vitro* obtenidas tras 2 o 3 ciclos de regeneración, se realizó una primera selección de clones transgénicos por PCR con los cebadores L1 y L2 en el caso de haber usado pL3 como vector de transformación y F1 (5'- AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGC-3') y F2 (5'- CCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACG-3') para el caso de haber usado pAF (resultados no mostrados). Se extrajo ADN genómico y se utilizó como molde 1 µg de ADN en

una PCR de 30 ciclos. Finalmente, se seleccionaron plantas homoplásmicas de todas las construcciones mediante transferencia de Southern (Fig. 13). En la Tabla 3 aparecen los distintos fragmentos generados por digestión *Bgl*II (en el caso de los vectores pL3) o *Hind*III (para los vectores pAF), y que hibridarán con cada una de las sondas utilizadas en la transferencia de Southern.

5 **Tabla 3.** Tamaño de los fragmentos generados en la transferencia de Southern, que hibridarán con las sondas homólogas a las zonas de recombinación.

Plantas transformadas con el vector	Digestión del ADN genómico	Tamaño de bandas hibridadas (kb)
Control PH	<i>Hind</i> III	7.7
pAFpsbATRXm/f-EK-HSA	<i>Hind</i> III	8.2 + 3.3
pAFpsbAHSA::PrmG10LTRXm/f	<i>Hind</i> III	10.2 + 1.5
Control PH	<i>Bgl</i> II	4.5
pL3psbATRXm/f-EK-CT1	<i>Bgl</i> II	4.9 + 2.5
pL3psbACT1::PrmG10LTRXm/f	<i>Bgl</i> II	5.5 + 2.1

- Ejemplo 9.- Efecto de la fusión de las Trx *m* ó *f* con proteínas heterólogas.

10 En primer lugar se analizaron las cantidades de HSA acumuladas en hojas de plantas adultas cultivadas en fitotrón, de las que se extrajo la proteína total (Farran et al, 2002). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un anti-HSA, se comprobó que las plantas que expresaban la HSA fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas presentaba un patrón de bandas (Fig. 14a, calles 2-4) similar al observado en la muestras de plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14a, calle 1). Se puede observar una gran cantidad de agregados de alto peso molecular, lo que podría estar indicando la acumulación, en el cloroplasto, de la proteína de fusión en cuerpos de inclusión, tal y como ocurre cuando la HSA se expresa sola (Fernández-San Millán et al, 2003). Dada la gran cantidad de proteína recombinante observada en la inmunodetección de las plantas que expresan la fusión de las Trx's con la HSA, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE (Fig. 14b). En los extractos de las hojas que expresan la fusión de las Trx's con la HSA, además de la banda correspondiente a la subunidad grande de la RuBisCo (aprox. 50 kDa), se observa una intensa banda teñida con CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) de un tamaño aproximado de 80 kDa (Fig. 14b, calles 1-4). Dicha banda no aparece en los extractos de hoja de las plantas sin transformar (Fig. 14b, PH) ni en el de las plantas que expresan la HSA sola (Fig. 14b, calle 5). En estas últimas sin embargo, se puede visualizar una banda más tenue, de unos 67 kDa, correspondiente a la HSA. Estos resultados indican que se acumula una gran cantidad de proteína de fusión TrxHSA en los cloroplastos de tabaco, incluso a niveles superiores a los máximos obtenidos en las plantas que expresan la HSA sola (≈11% de la proteína total; Fernández-San Millán et al, 2003). Se sabe que la subunidad grande de la RuBisCo representa aproximadamente el 50% de la proteína soluble total de la hoja (Whitney et al, 1999). Si comparamos la intensidad de la banda de 80 kDa, correspondiente a la proteína de fusión TrxHSA, con la de la subunidad grande de la RuBisCo, podríamos estimar unos niveles de expresión de la Trxm/fHSA entre un 15-20% de la proteína soluble total.

30 Algo similar ocurre cuando analizamos la fusión de las Trx con la cardiotrofina-1 humana. Estudios preliminares sobre la expresión de hCT1 en cloroplastos de tabaco demostraron que la rhCT1 se acumulaba a altos niveles (≈3% de la proteína soluble total) en hojas jóvenes, y se conseguía duplicar estos niveles sometiendo a las plantas a 32 horas de luz continua (Farran et al, 2008). Mediante inmunodetección y utilizando como anticuerpo primario un monoclonal frente a hCT1, se comprobó que las plantas que expresaban la hCT1 fusionada a cualquiera de las dos tiorredoxinas (Trxm/fCT1) presentaba mayores niveles de rhCT1 que las plantas control (CT1), independientemente de la condición lumínica utilizada (Fig. 15).

Por lo que podemos concluir que la fusión de cualquiera de las Trx con una proteína heteróloga cualquiera, proporciona una mayor estabilidad a la proteína de interés, que se traduce en una mayor acumulación de la misma incluso en hojas maduras y sin necesidad de someter a las plantas a condiciones de luz continua.

40 **- Ejemplo 10.- Efecto de la coexpresión de las Trx *m* ó *f* con albúmina sérica humana.** Los agregados que forman la HSA sola (Fernández-San Millán et al, 2003) o fusionada a Trx (ejemplo 9) expresadas en cloroplastos de tabaco, desaparecen cuando la albúmina es co-expresada con alguna de las tiorredoxinas (Fig.

14a, calles 5-7), sugiriendo un posible papel de las Trx en la solubilización de los cuerpos de inclusión de HSA. Resultados similares han sido descritos por otros autores utilizando la TrxA bacteriana y en sistemas de expresión unicelulares (Yuan et al, 2004). Además, parece que la expresión de la tiorredoxina en forma libre o fusionada tiene diferente modo de acción sobre la solubilidad de las proteínas recombinantes, lo que explicaría el hecho de que sólo se consiga la disolución de los agregados cuando se coexpresan ambas proteínas. Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes (Enfors, 1992), y puede facilitar la purificación de las mismas; por otro lado requiere un replegamiento *in vitro* que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso. Por lo que en muchos casos puede resultar interesante disponer de un sistema de solubilización para la expresión de proteínas heterólogas en los cloroplastos de cualquier organismo fotosintético.

- Ejemplo 11- Bioactividad de la cardiotrofina-1 humana recombinante obtenida con la fusión o coexpresión de las Trx.

Para estudiar la funcionalidad de la rhCT1 producida en cloroplastos de tabaco, se estudió su capacidad para inducir la fosforilación del factor de transcripción STAT-3. El ensayo se llevó a cabo en la línea HepG2 de hepatocarcinoma humano. Los extractos de las células estimuladas se analizaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos de la forma fosforilada de STAT-3 (Figura16). Como control negativo se utilizó extracto proteico de tabaco sin transformar y como positivo se utilizó hCT1 comercial (PrepoTech) sola o añadida al extracto crudo de tabaco sin transformar (Fig. 16a). Cuando el bioensayo se realizó con la rhCT1 obtenida a partir de las distintas plantas transformadas, se vio que ésta era capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 independientemente del extracto de planta utilizado (Fig. 16b). Sin embargo, dicha fosforilación fue mucho más intensa en el caso de las células estimuladas con extracto de plantas que expresaban la CT1 fusionada o coexpresada con cualquiera de las tiorredoxinas cloroplásticas probadas, sugiriendo que las tiorredoxinas pueden jugar un papel importante en mejorar la bioactividad de la rhCT1 producida en cloroplastos de hojas de tabaco.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector de coexpresión plastidial derivado de un plásmido que comprende un fragmento de ADN que codifica tiorredoxina f o su precursor seleccionado del grupo formado por: SEQ ID N°:1 y codón de inicio ATG unido a SEQ ID N°:3, unido operativamente al promotor *Prrn* y a la secuencia del sitio de unión al ribosoma (RBS) de la región líder del gen 10 del bacteriófago T7 (G10L); y una secuencia que codifica una proteína heteróloga, unida operativamente al promotor *psbA* de *Nicotiana tabacum*.
- 10 2. Vector según la reivindicación 1 derivado del plásmido pAF, en el que la proteína heteróloga codificada es la albúmina sérica humana (HSA), unida operativamente al promotor *psbA* de *Nicotiana tabacum*, que es el plásmido representado como pAFpsbAHSA::PrrnG10L TRXf.
3. Vector según la reivindicación 1 derivado del plásmido pL3, en el que la proteína heteróloga codificada es la cardiotrofina-1 humana (hCT1), que es el plásmido representado como pL3PrrnG10LTRXf::psbAhCT1.
- 15 4. Un organismo hospedador transformado con un vector plastidial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Organismo hospedador según la reivindicación 4, que consiste en una planta transgénica, sus semillas o material de propagación, caracterizada por que su genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homóloga de los vectores según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 6. Planta transgénica según la reivindicación 5, cuyo genoma plastidial lleva integrada la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homóloga del vector de la reivindicación 2.
7. Planta transgénica según la reivindicación 5, cuyo genoma plastidial lleva integrado la secuencia comprendida entre las secuencias de recombinación homóloga del vector de la reivindicación 3.
8. Planta transgénica según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, perteneciente a las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum*.
- 25 9. Método de obtención de las plantas transgénicas de las reivindicaciones 5-8, que comprende la integración de un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, por cualquier medio apropiado, en el plastoma de una planta.
10. Método según la reivindicación 11, que comprende las siguientes etapas:
 - a) bombardeo de hojas cultivadas *in vitro* con una pistola de genes cargada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
 - b) obtención de los primeros transformantes regenerados en medio de cultivo suplementado con un antibiótico frente al cual confiera resistencia el vector bombardeado;
 - c) realización de, al menos, un segundo ciclo de regeneración en medio selectivo con el mismo antibiótico, para obtener plantas homoplásmicas;
 - 35 d) selección de las plantas homoplásmicas mediante cualquier método de selección de ADN por tamaños.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que, las hojas proceden de las especies *Nicotiana tabacum* o *Solanum tuberosum* y el antibiótico utilizado es espectinomicina.
- 40 12. Uso de una planta transgénica transformada con un vector de expresión plastidial recombinante que comprende: un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo formado por: precursor de tiorredoxina f, tiorredoxina f madura; y, adicionalmente, secuencias de recombinación homóloga que permiten dirigir la inserción en el genoma plastidial de los fragmentos comprendidos entre ellas, un promotor constitutivo endógeno plastidial y una secuencia inductora de la traducción; seleccionándose dicho vector del grupo formado por el plásmido pL3psbATRXf y el plásmido pL3PrrnG10LTRXf, para aumentar las cantidades de almidón y sacarosa acumuladas en la planta, siendo dichas cantidades hasta 10 veces superiores a las acumuladas en los mismos tejidos u órganos de las plantas silvestres correspondientes, cultivadas en condiciones idénticas.
- 45 13. Uso de la planta transgénica descrita en la reivindicación 8, para la producción de proteína cardiotrofina-1 humana recombinante de bioactividad incrementada en al menos el doble respecto a la proteína cardiotrofina-1 humana expresada sola en cloroplastos.
- 50 14. Composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante obtenida a partir de la planta transgénica descrita en la reivindicación 8, junto con un adjuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Procedimiento para sobreexpresar proteínas heterólogas en forma soluble y activa, que comprende las siguientes etapas:

- a) obtener el vector de coexpresión plastidial descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- b) transformar un organismo hospedador bacteriano o una planta con el vector de la etapa a).

5

16. Procedimiento según la reivindicación 15 para sobreexpresar HSA, en el que:

- a) el vector de coexpresión es el descrito en la reivindicación 2; y
- b) el organismo hospedador es la planta transgénica descrita en la reivindicación 6.

17. Procedimiento según la reivindicación 15 para sobreexpresar hCT1, en el que:

- a) el vector de coexpresión es el descrito en la reivindicación 3; y
- b) el organismo hospedador es la planta transgénica descrita en la reivindicación 7.

10

18. Método de producción de proteínas heterólogas biológicamente activas y/o en su conformación nativa, que comprende:

a) cultivar las plantas transgénicas descritas en las reivindicaciones 5-8, en condiciones apropiadas para su crecimiento;

15

b) separar las partes verdes de la planta;

c) purificar la proteína heteróloga utilizando técnicas de cromatografía de afinidad, de separación por tamaños con un patrón o de intercambio iónico.

19. Método según la reivindicación 18 para producir albúmina sérica humana recombinante en forma soluble y conformación nativa, en el que la planta transgénica de la etapa a) es la descrita en la reivindicación 6.

20

(a) Nt-Trxf

```

1  ATGGCGTTGC AAGTGCAAGT AAACGGCGTA TCCTTGAAGC CTTCAACGGT GCCTTCATCT
61  TCTGCATGGA GGTCCAGCAA GCAATCAGTG GTCTGCGTTG CAGGAGATTA TGGCTTTTCG
121 CCTAGGGTTT TTAACAACAG GGGGCTGAGT TTGAAGGTGA AGTGTAGCTC CGATGCTACT
181 GCTACTACCA GTGTGACGGT AGGGCAGGTG ACTGAAGTTT GTAAAGATAC CTTTGGCCT
241 ATTGTGAAG CTGCCGGTGA TAAACTGTC GTAGTTGACA TGTACACTCA GTGGTGTGGT
301 CCTTGCAAAG TGATTGCTCC AAAGTPTCAA GAACTGTCGA AGAATTATAA TGACGTGGTC
361 TTTCTGAAGC TTGATTGCAA CCAGGATAAT AGGCCACTAG CCAAGGAACT AGGCATAAAG
421 GTGGTTCCAA CGTTCAAGAT TCTGAAGAAT AATAAGGTCG TTAAAGAAGT CACTGGAGCA
481 AAACCTGATA ATTTAATAGC GGCAATTGAG GATGTCCGGT CAAGTTAA

```

(b) Nt-Trxm

```

1  CCTTCGGCAC TGCCGTGCTC GTCACGGCT CCGGTAGCCG GTTCTTCCTT CTCAAGTCCT
61  CGTTCCTCCG TTAGATTCTC TCAATTCAGA GGCCTTAAGA TCCAGTCAAC TCGCTCATCC
121 GTCTCCACTA CCTCATGCTC AAAAATCATT CCCGGACGAG CTCGAATCGT CTGCCAAGCG
181 CAAAATACTG CCCTTGAAGT GGGTGCTGTT AATGATAAAA CATGGAAGTC ACTTGTGTGA
241 GAGTCTGATA TACCTGTCCT GGTGAATTT TGGGCTCCGT GGTGTGGTCC ATGCCGAATG
301 ATCCACCCGG TCATTGATGA ACTGGCAAAG GAATATGCTG GCAAGCTTAA ATTCTTCAAG
361 CTGAACACGG ACGAAAGCCC TTCCACAGCA ACCGAATTGG GGATTCCAAG CATCCCAACT
421 GTGATGATTT TCAAGAATGG AGAGAAGAAA GATGCAGTCA TTGGTGCAGT TCCTAAATCA
481 AACTAACCA CCTGCATAGA GAAATCTTG TAA

```

(c) Nt-Trxf (aa)

```

1  MALQVQVNGV SLKPSTVPSS SAWRSSKQSV VCVAGDYGFS PRVFNNRGLS LKVKCSSDAT
61  ATTSVTVGQV TEVCKDTFWP IVEAAGDKTV VVDMYTQWCG PCKVIAPKFQ ELSKNYNQDVV
121 FLKLDQNQDN REPLAKELGIK VVPTFKILKN NKVVKEVTGA KLDNLIAAIE DVRSS*

```

(d) Nt-Trxm (aa)

```

1  PSALPSSSLA PVAGSSFSSP RSSVRFSQFR GLKIQSTRSS VSTTSCSKII PGRARIVCEA
61  QNTALEVGAV NDKTWKSLVV ESDIPVLVEF WAPWCGPCRM IHPVIDELAK EYAGKLKFEK
121 LNTDESPSTA TELGIRSIPT VMIFKNKEKK DAVIGAVPKS TLTTCKIEKFL *

```

FIG. 1

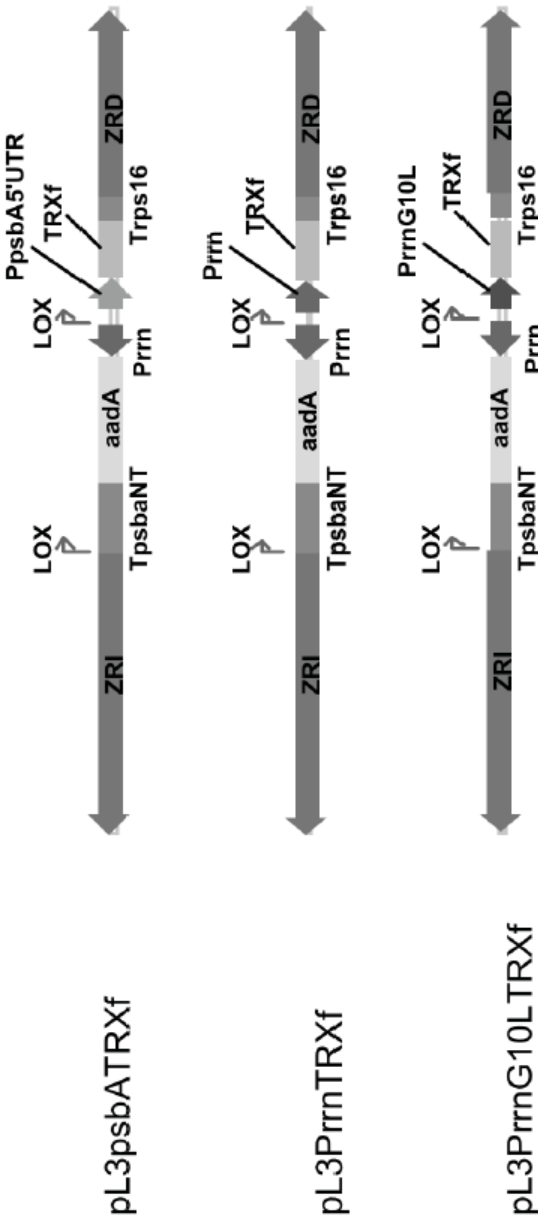


FIG.2

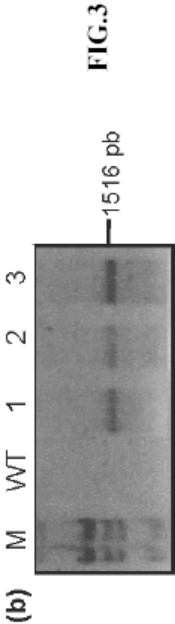
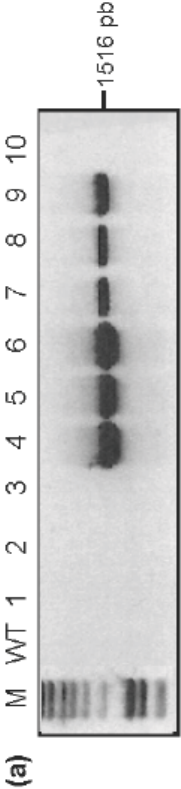
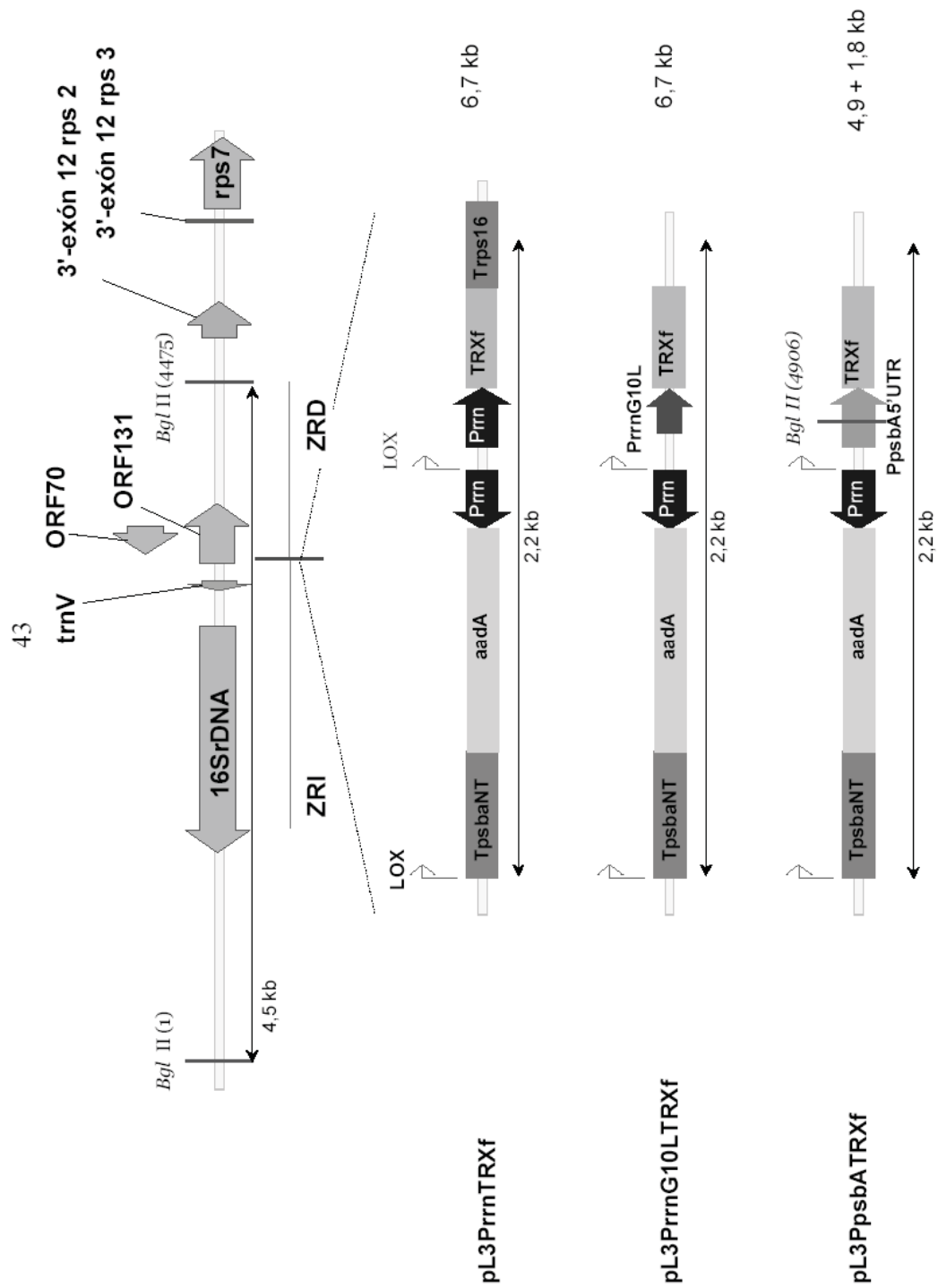


FIG.3



(b)

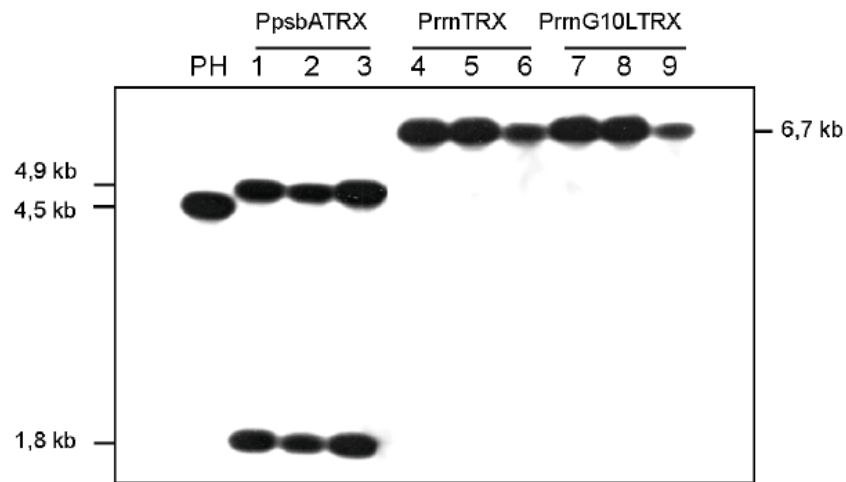


FIG.4 (CONT.)

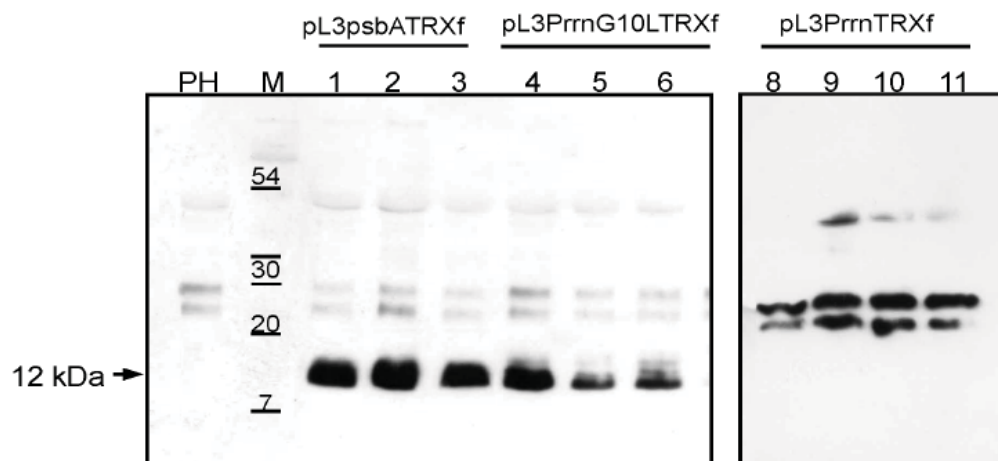
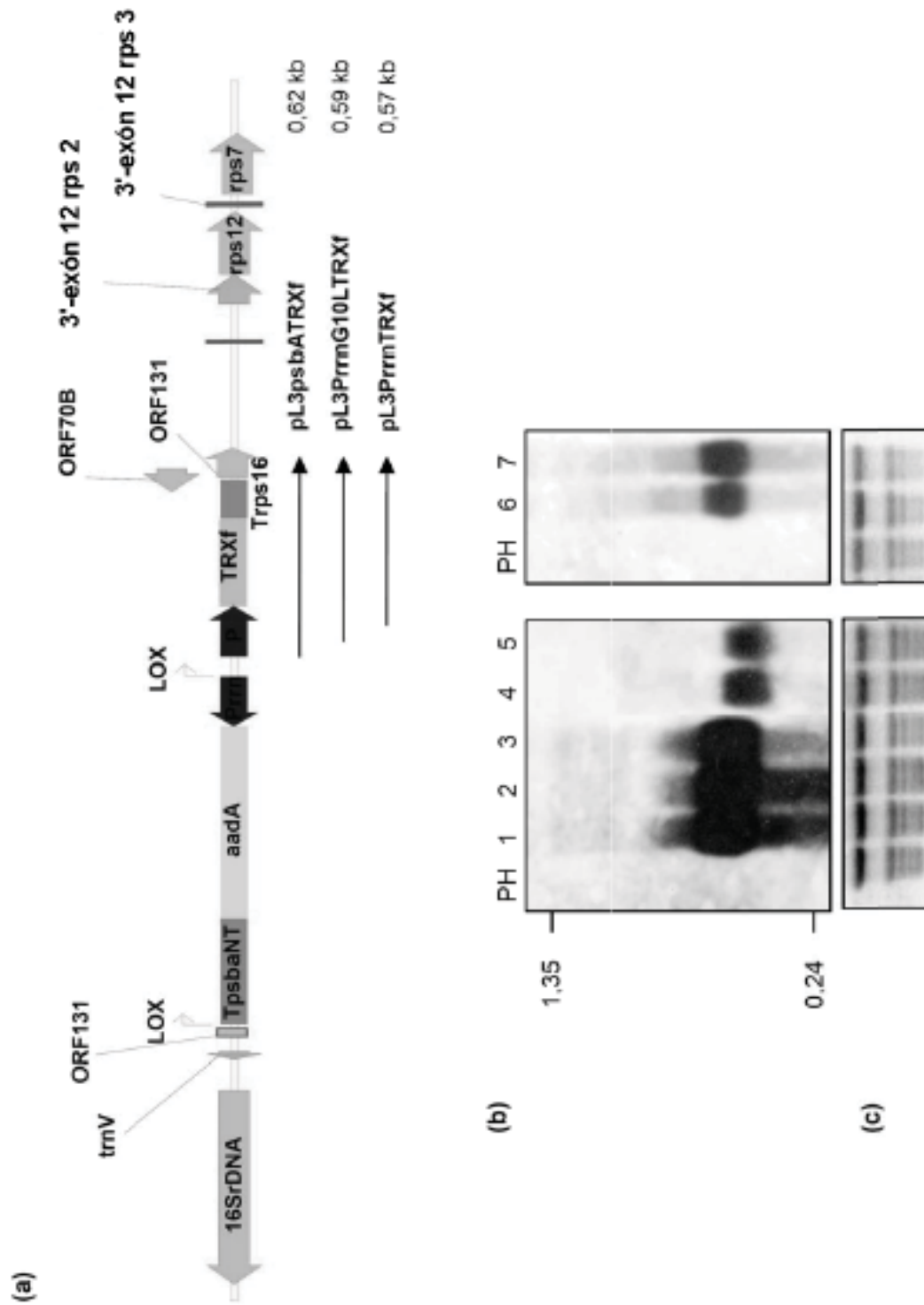


FIG. 5



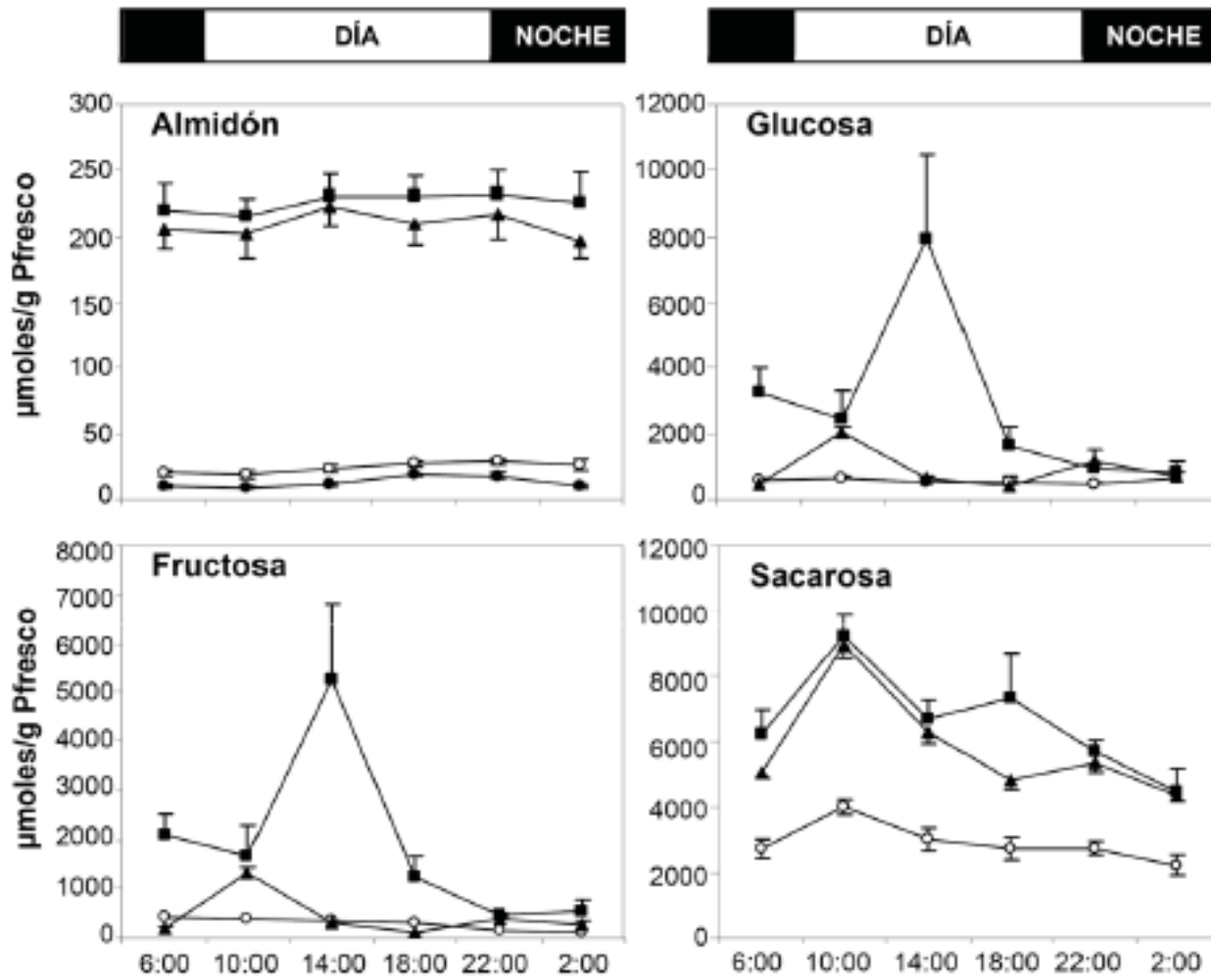


FIG. 7

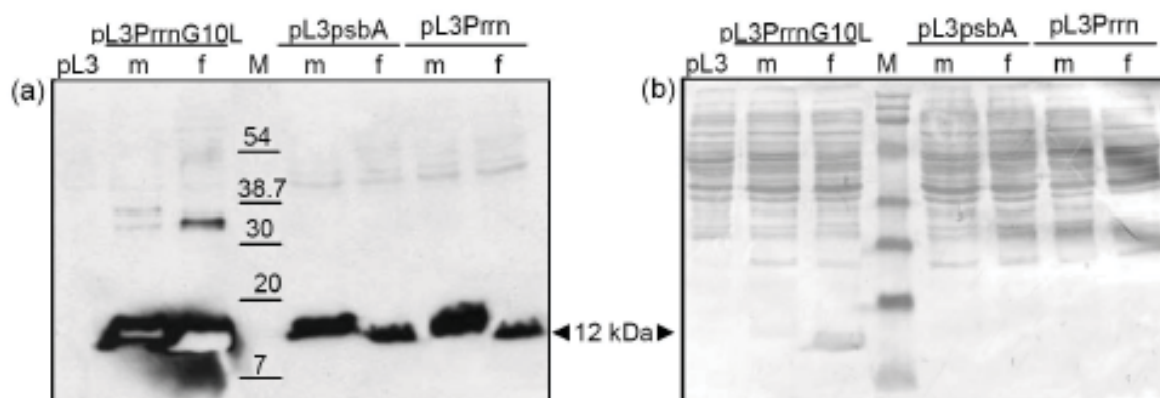


FIG. 8

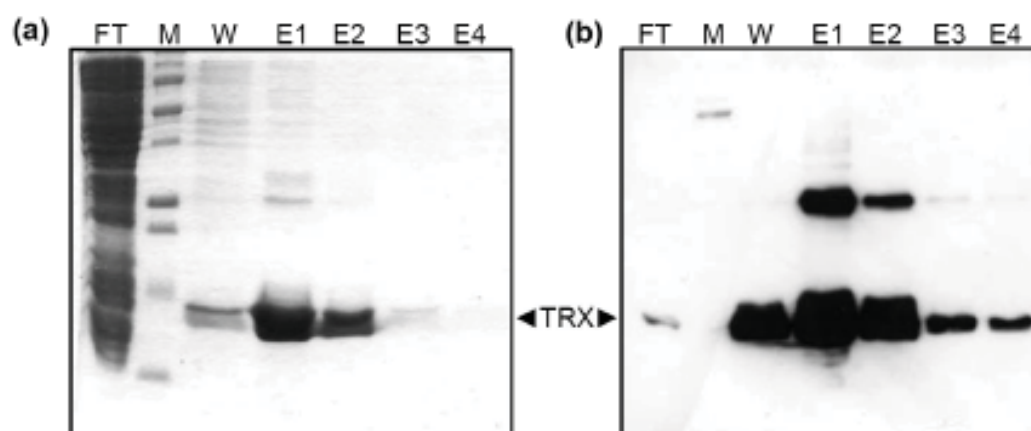


FIG. 9

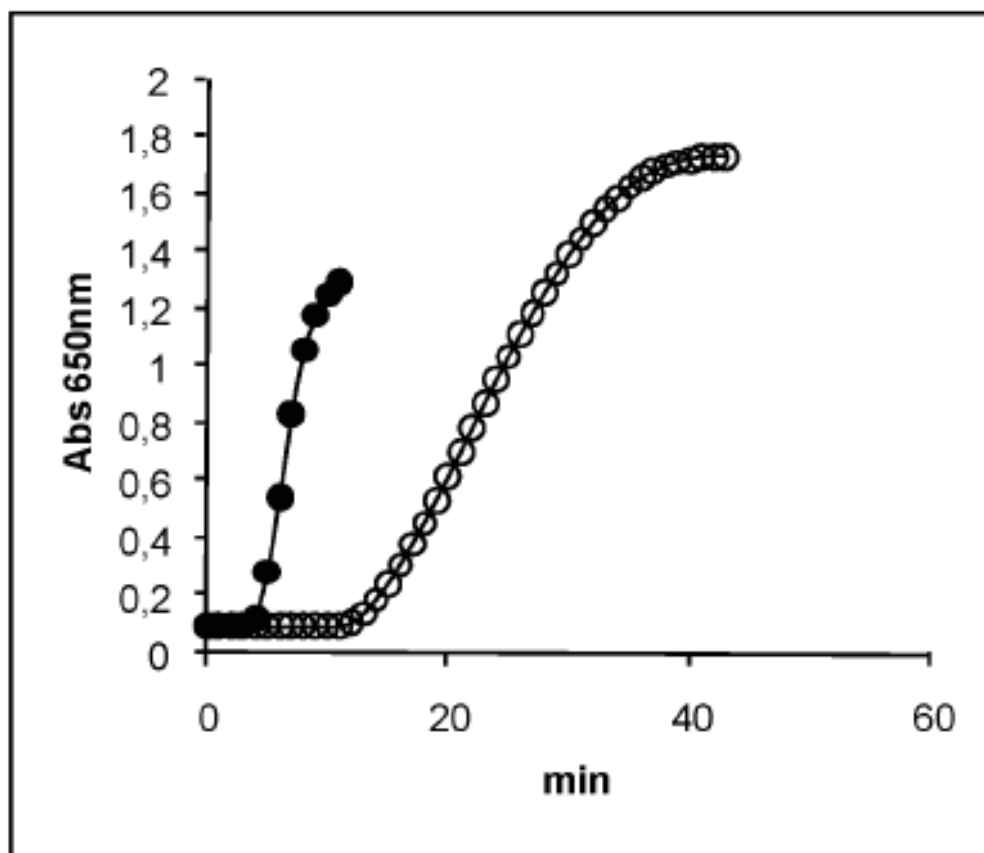


FIG.10

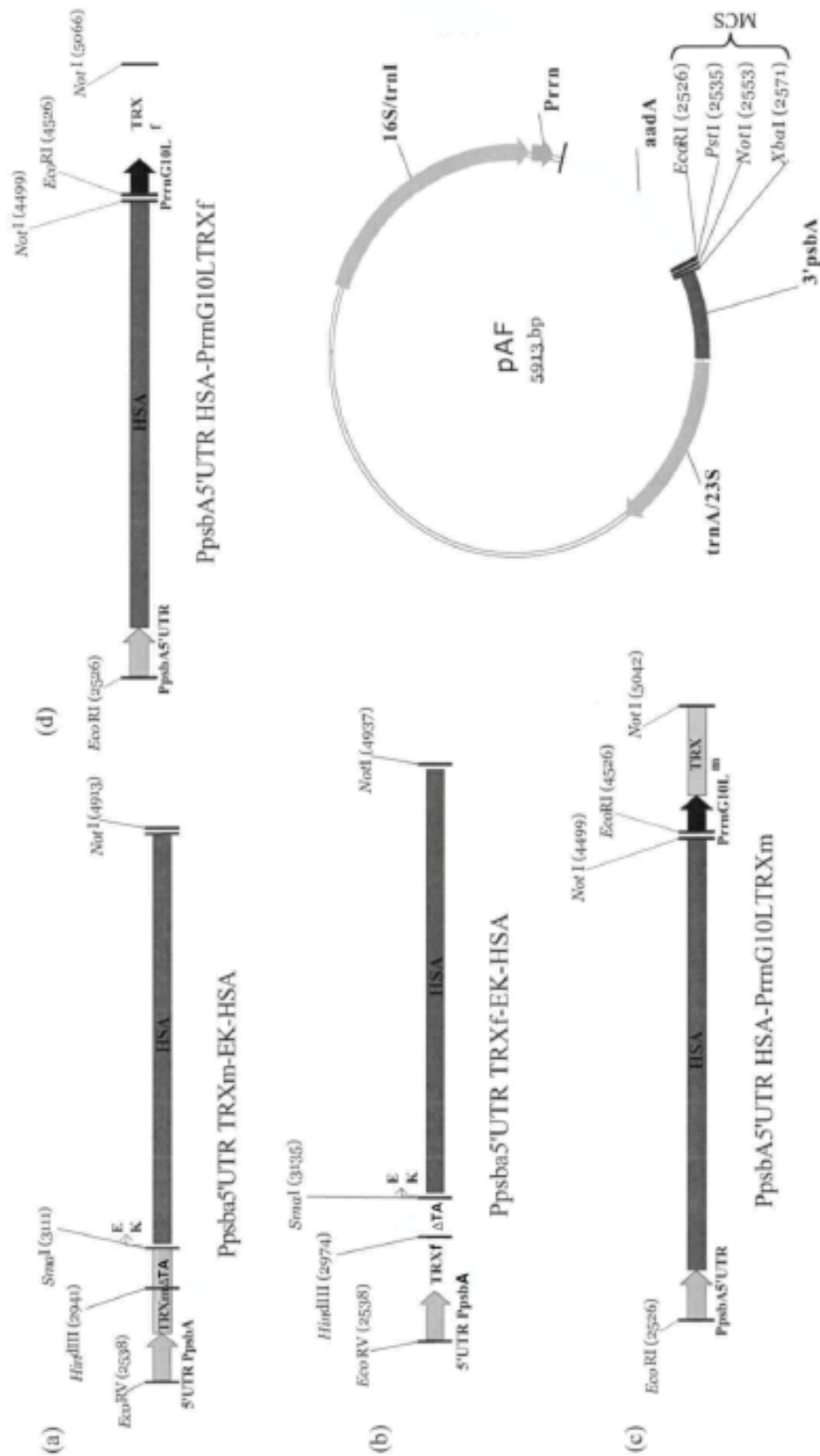


FIG. 11

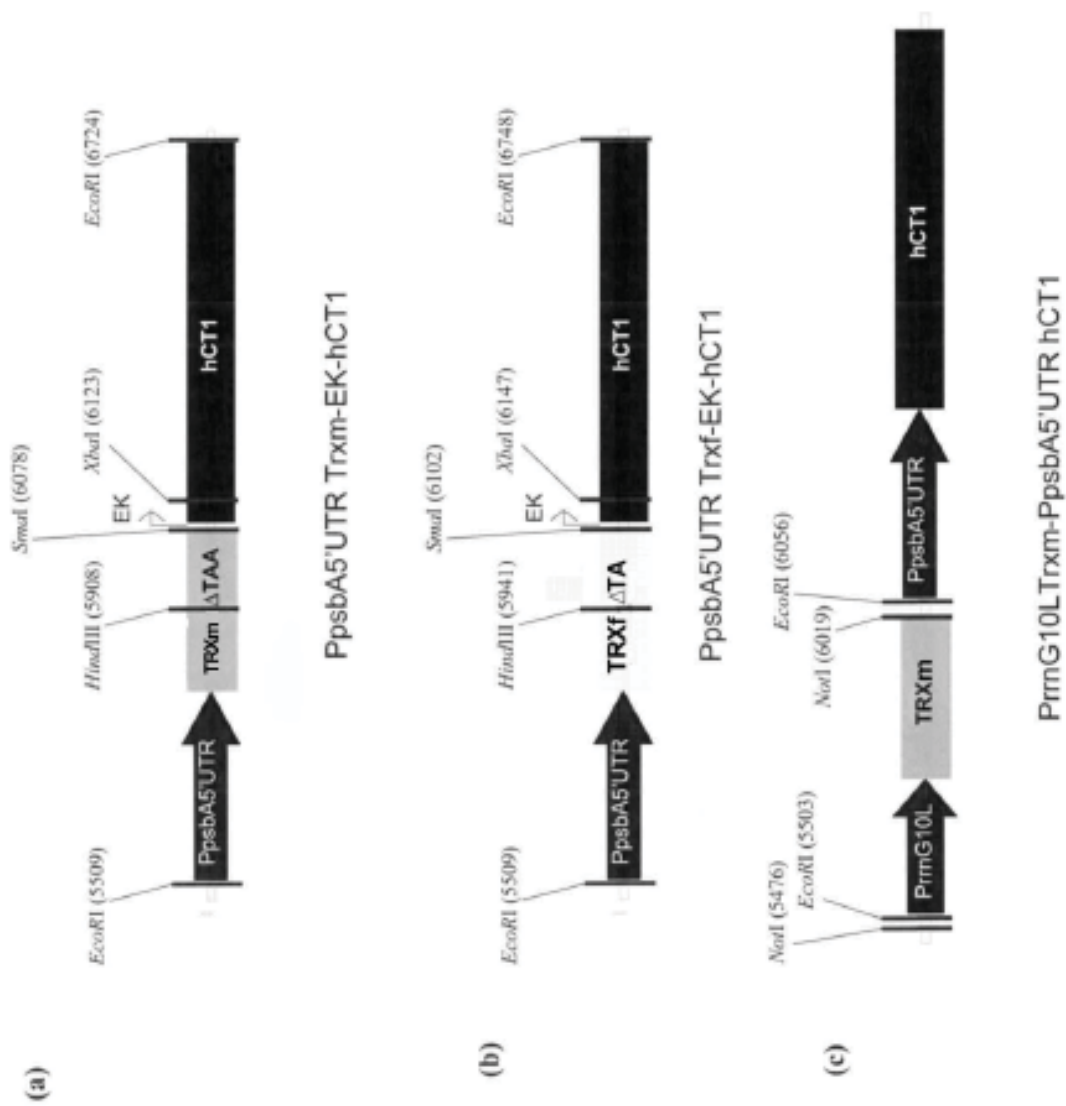


FIG. 12

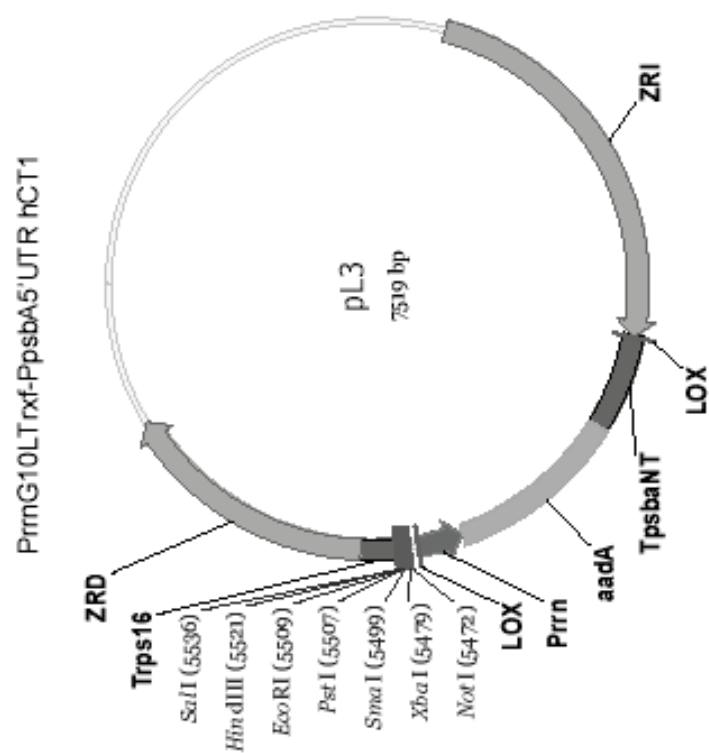
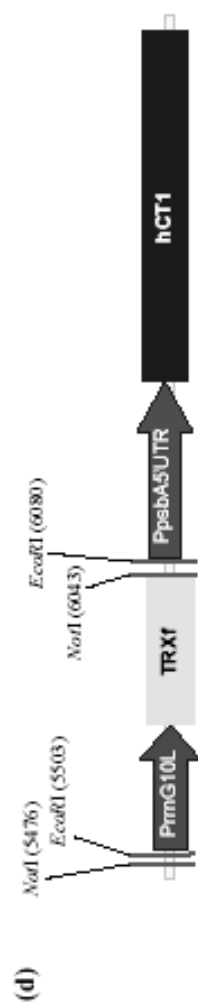


FIG.12 (CONT.)

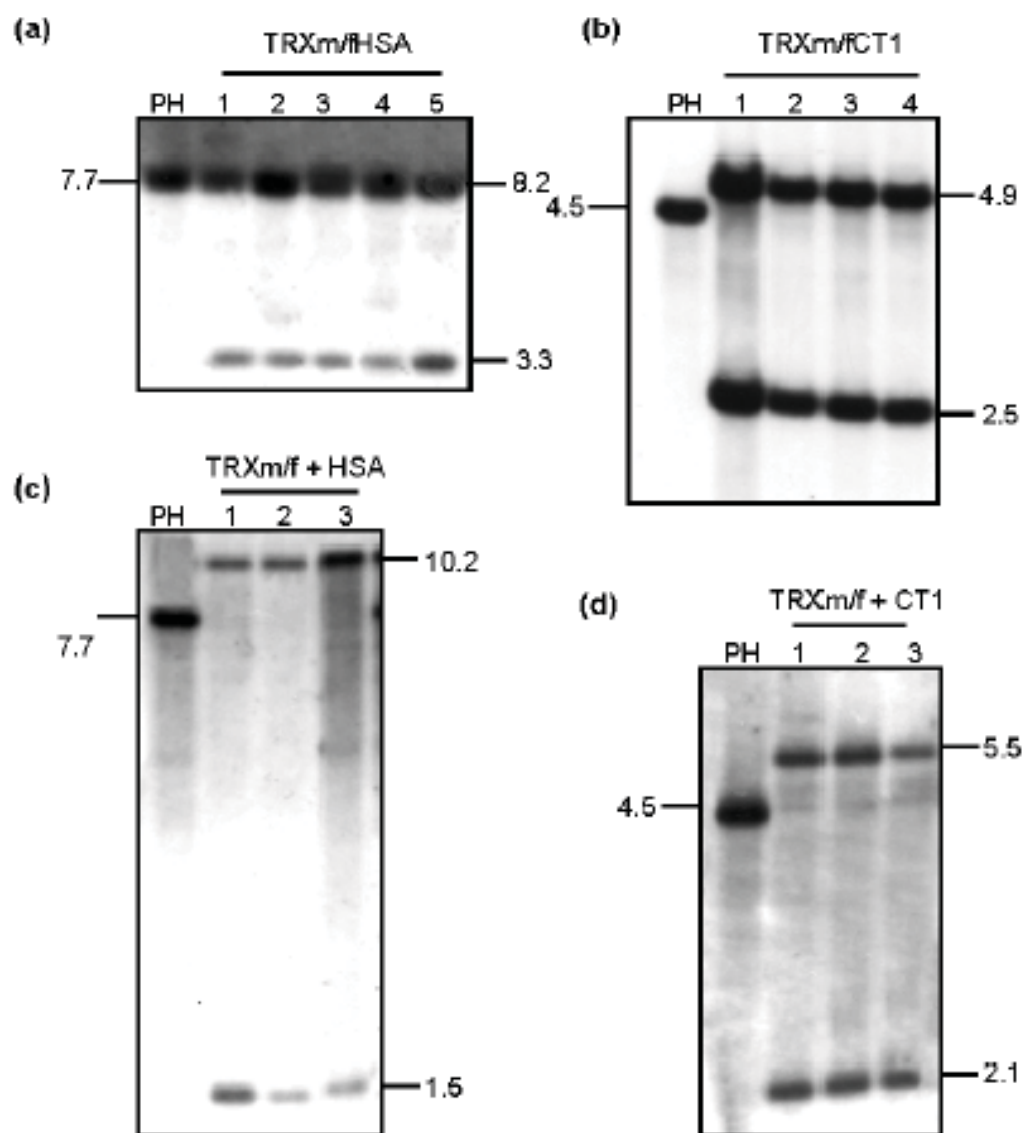
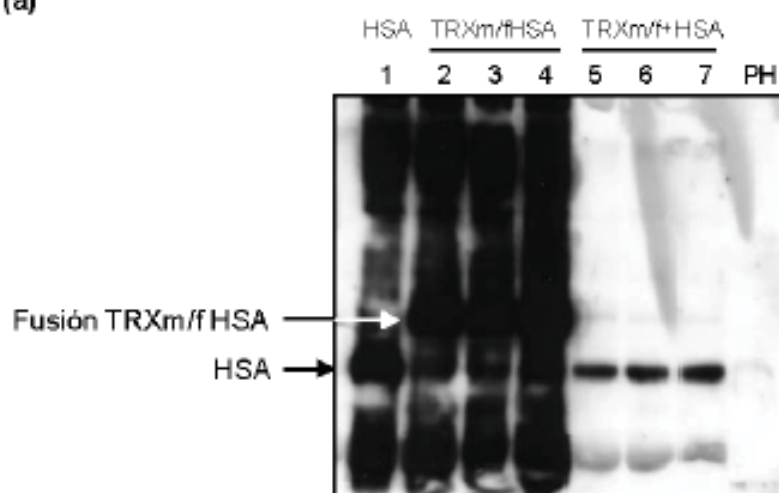


FIG. 13

(a)



(b)

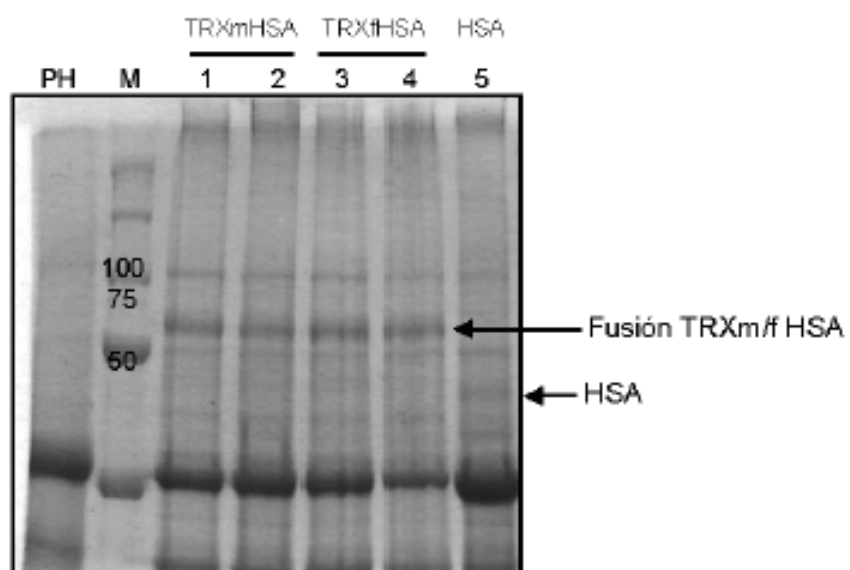


FIG. 14

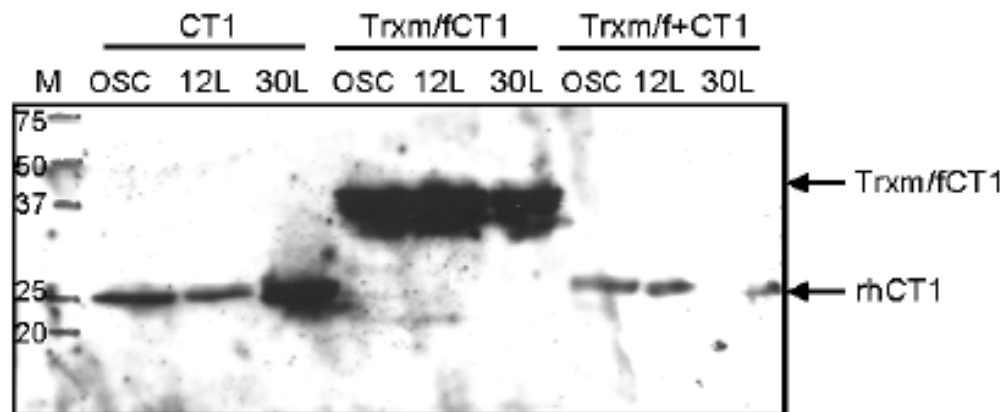


FIG. 15

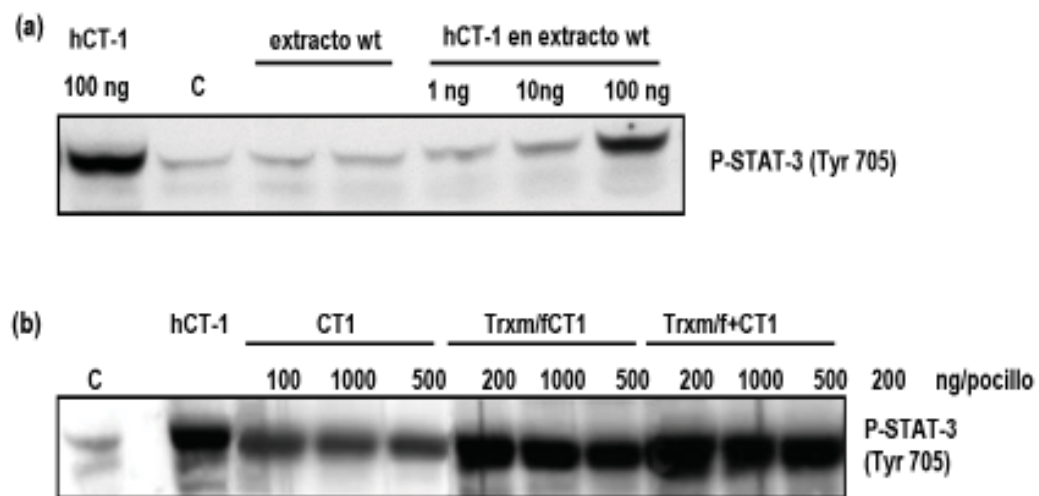


FIG. 16

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA-CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS	
	<120> Tiorredoxinas plastidiales: sobreexpresión y aplicaciones biotecnológicas	
10	<130> P-100710	
	<160> 8	
15	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 528	
	<212> DNA	
20	<213> Nicotiana tabacum	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(528)	
25	<223> ADN codificante de proteína precursora de Trx f	
	<220>	
	<221> Péptido de tránsito	
	<222> (1)..(165)	
30	<223> ADN codificante de péptido de tránsito	
	<400> 1	
	atg gcg ttg caa gtg caa gta aac ggc gta tcc ttg aag cct tca acg	48
35	Met Ala Leu Gln Val Gln Val Asn Gly Val Ser Leu Lys Pro Ser Thr	
	1 5 10 15	
	gtg cct tca tct tct gca tgg agg tcc agc aag caa tca gtg gtc tgc	96
	Val Pro Ser Ser Ser Ala Trp Arg Ser Ser Lys Gln Ser Val Val Cys	
	20 25 30	
40	gtt gca gga gat tat ggc ttt tcg cct agg gtt ttt aac aac agg ggg	144
	Val Ala Gly Asp Tyr Gly Phe Ser Pro Arg Val Phe Asn Asn Arg Gly	
	35 40 45	
45	ctg agt ttg aag gtg aag tgt agc tcc gat gct act gct act acc agt	192
	Leu Ser Leu Lys Val Lys Cys Ser Ser Asp Ala Thr Ala Thr Thr Ser	
	50 55 60	
	gtg acg gta ggg cag gtg act gaa gtt tgt aaa gat acc ttt tgg cct	240
50	Val Thr Val Gly Gln Val Thr Glu Val Cys Lys Asp Thr Phe Trp Pro	
	65 70 75 80	
	att gtt gaa gct gcc ggt gat aaa act gtc gta gtt gac atg tac act	288
55	Ile Val Glu Ala Ala Gly Asp Lys Thr Val Val Val Asp Met Tyr Thr	
	85 90 95	
	cag tgg tgt ggt cct tgc aaa gtg att gct cca aag ttt caa gaa ctg	336
60	Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys Val Ile Ala Pro Lys Phe Gln Glu Leu	
	100 105 110	

ES 2 384 777 B1

	tcg aag aat tat aat gac gtg gtc ttt ctg aag ctt gat tgc aac cag	384
	Ser Lys Asn Tyr Asn Asp Val Val Phe Leu Lys Leu Asp Cys Asn Gln	
	115 120 125	
5	gat aat agg cca cta gcc aag gaa cta ggc ata aag gtg gtt cca acg	432
	Asp Asn Arg Pro Leu Ala Lys Glu Leu Gly Ile Lys Val Val Pro Thr	
	130 135 140	
10	ttc aag att ctg aag aat aat aag gtc gtt aaa gaa gtc act gga gca	480
	Phe Lys Ile Leu Lys Asn Asn Lys Val Val Lys Glu Val Thr Gly Ala	
	145 150 155 160	
15	aaa ctt gat aat tta ata gcg gca att gag gat gtg cgg tca agt taa	528
	Lys Leu Asp Asn Leu Ile Ala Ala Ile Glu Asp Val Arg Ser Ser	
	165 170 175	
20	<210> 2	
	<211> 175	
	<212> PRT	
	<213> Nicotiana tabacum	
	<400> 2	
25	Met Ala Leu Gln Val Gln Val Asn Gly Val Ser Leu Lys Pro Ser Thr	
	1 5 10 15	
30	Val Pro Ser Ser Ser Ala Trp Arg Ser Ser Lys Gln Ser Val Val Cys	
	20 25 30	
35	Val Ala Gly Asp Tyr Gly Phe Ser Pro Arg Val Phe Asn Asn Arg Gly	
	35 40 45	
40	Leu Ser Leu Lys Val Lys Cys Ser Ser Asp Ala Thr Ala Thr Thr Ser	
	50 55 60	
45	Val Thr Val Gly Gln Val Thr Glu Val Cys Lys Asp Thr Phe Trp Pro	
	65 70 75 80	
50	Ile Val Glu Ala Ala Gly Asp Lys Thr Val Val Val Asp Met Tyr Thr	
	85 90 95	
	Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys Val Ile Ala Pro Lys Phe Gln Glu Leu	
	100 105 110	
55	Ser Lys Asn Tyr Asn Asp Val Val Phe Leu Lys Leu Asp Cys Asn Gln	
	115 120 125	
60	Asp Asn Arg Pro Leu Ala Lys Glu Leu Gly Ile Lys Val Val Pro Thr	
	130 135 140	
65	Phe Lys Ile Leu Lys Asn Asn Lys Val Val Lys Glu Val Thr Gly Ala	
	145 150 155 160	

ES 2 384 777 B1

Lys Leu Asp Asn Leu Ile Ala Ala Ile Glu Asp Val Arg Ser Ser
 165 170 175
 5
 <210> 3
 <211> 363
 <212> DNA
 10 <213> Nicotiana tabacum
 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(363)
 <223> ADN codificante de proteína Trx f madura
 <400> 3
 20 agc tcc gat gct act gct act acc agt gtg acg gta ggg cag gtg act 48
 Ser Ser Asp Ala Thr Ala Thr Thr Ser Val Thr Val Gly Gln Val Thr
 1 5 10 15
 gaa gtt tgt aaa gat acc ttt tgg cct att gtt gaa gct gcc ggt gat 96
 25 Glu Val Cys Lys Asp Thr Phe Trp Pro Ile Val Glu Ala Ala Gly Asp
 20 25 30
 aaa act gtc gta gtt gac atg tac act cag tgg tgt ggt cct tgc aaa 144
 30 Lys Thr Val Val Val Asp Met Tyr Thr Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys
 35 40 45
 gtg att gct cca aag ttt caa gaa ctg tcg aag aat tat aat gac gtg 192
 Val Ile Ala Pro Lys Phe Gln Glu Leu Ser Lys Asn Tyr Asn Asp Val
 50 55 60
 35 gtc ttt ctg aag ctt gat tgc aac cag gat aat agg cca cta gcc aag 240
 Val Phe Leu Lys Leu Asp Cys Asn Gln Asp Asn Arg Pro Leu Ala Lys
 65 70 75 80
 gaa cta ggc ata aag gtg gtt cca acg ttc aag att ctg aag aat aat 288
 40 Glu Leu Gly Ile Lys Val Val Pro Thr Phe Lys Ile Leu Lys Asn Asn
 85 90 95
 aag gtc gtt aaa gaa gtc act gga gca aaa ctt gat aat tta ata gcg 336
 45 Lys Val Val Lys Glu Val Thr Gly Ala Lys Leu Asp Asn Leu Ile Ala
 100 105 110
 gca att gag gat gtg cgg tca agt taa 363
 Ala Ile Glu Asp Val Arg Ser Ser
 115 120
 50
 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum
 55
 <400> 4
 Ser Ser Asp Ala Thr Ala Thr Thr Ser Val Thr Val Gly Gln Val Thr
 1 5 10 15
 60

ES 2 384 777 B1

	Glu	Val	Cys	Lys	Asp	Thr	Phe	Trp	Pro	Ile	Val	Glu	Ala	Ala	Gly	Asp	
				20					25					30			
5	Lys	Thr	Val	Val	Val	Asp	Met	Tyr	Thr	Gln	Trp	Cys	Gly	Pro	Cys	Lys	
			35					40					45				
10	Val	Ile	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Asn	Tyr	Asn	Asp	Val	
		50					55					60					
15	Val	Phe	Leu	Lys	Leu	Asp	Cys	Asn	Gln	Asp	Asn	Arg	Pro	Leu	Ala	Lys	
	65					70				75						80	
20	Glu	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Val	Pro	Thr	Phe	Lys	Ile	Leu	Lys	Asn	Asn	
				85						90					95		
	Lys	Val	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu	Asp	Asn	Leu	Ile	Ala	
				100					105					110			
25	Ala	Ile	Glu	Asp	Val	Arg	Ser	Ser									
			115					120									
30	<210>	5															
	<211>	513															
	<212>	DNA															
	<213>	Nicotiana tabacum															
35	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(513)															
	<223>	ADN codificante de proteína precursora de Trx m															
40	<220>																
	<221>	Péptido de tránsito															
	<222>	(1)..(174)															
	<223>	ADN codificante de péptido de tránsito															
45	<400>	5															
	cct	tcg	gca	ctg	ccg	tcg	tcg	tca	ctg	gct	ccg	gta	gcc	ggg	tct	tcc	48
	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	
	1				5					10				15			
50	ttc	tca	agt	cct	cgt	tcc	tcc	ggt	aga	ttc	tct	caa	ttc	aga	ggc	ctt	96
	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Ser	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Gln	Phe	Arg	Gly	Leu	
				20					25					30			
55	aag	atc	cag	tca	act	cgc	tca	tcc	gtc	tcc	act	acc	tca	tgc	tca	aaa	144
	Lys	Ile	Gln	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Ser	Cys	Ser	Lys	
			35					40					45				
60	atc	att	ccc	gga	cga	gct	cga	atc	gtc	tgc	gaa	gcg	caa	aat	act	gcc	192
	Ile	Ile	Pro	Gly	Arg	Ala	Arg	Ile	Val	Cys	Glu	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	
		50					55					60					

ES 2 384 777 B1

5	ctt gaa gtg ggt gct gtt aat gat aaa aca tgg aag tca ctt gtt gta	240
	Leu Glu Val Gly Ala Val Asn Asp Lys Thr Trp Lys Ser Leu Val Val	
	65 70 75 80	
10	gag tct gat ata cct gtc ctg gtt gaa ttt tgg gct ccg tgg tgt ggt	288
	Glu Ser Asp Ile Pro Val Leu Val Glu Phe Trp Ala Pro Trp Cys Gly	
	85 90 95	
15	cca tgc cga atg atc cac ccg gtc att gat gaa ctg gca aag gaa tat	336
	Pro Cys Arg Met Ile His Pro Val Ile Asp Glu Leu Ala Lys Glu Tyr	
	100 105 110	
20	gct ggc aag ctt aaa ttc ttc aag ctg aac acg gac gaa agc cct tcc	384
	Ala Gly Lys Leu Lys Phe Phe Lys Leu Asn Thr Asp Glu Ser Pro Ser	
	115 120 125	
25	aca gca acc gaa ttg ggg att cga agc atc cca act gtg atg att ttc	432
	Thr Ala Thr Glu Leu Gly Ile Arg Ser Ile Pro Thr Val Met Ile Phe	
	130 135 140	
30	aag aat gga gag aag aaa gat gca gtc att ggt gca gtt cct aaa tca	480
	Lys Asn Gly Glu Lys Lys Asp Ala Val Ile Gly Ala Val Pro Lys Ser	
	145 150 155 160	
35	aca cta acc acc tgc ata gag aaa ttc ttg taa	513
	Thr Leu Thr Thr Cys Ile Glu Lys Phe Leu	
	165 170	
40	<210> 6	
	<211> 170	
	<212> PRT	
	<213> Nicotiana tabacum	
45	<400> 6	
	Pro Ser Ala Leu Pro Ser Ser Ser Leu Ala Pro Val Ala Gly Ser Ser	
	1 5 10 15	
50	Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ser Val Arg Phe Ser Gln Phe Arg Gly Leu	
	20 25 30	
55	Lys Ile Gln Ser Thr Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Cys Ser Lys	
	35 40 45	
60	Ile Ile Pro Gly Arg Ala Arg Ile Val Cys Glu Ala Gln Asn Thr Ala	
	50 55 60	
65	Leu Glu Val Gly Ala Val Asn Asp Lys Thr Trp Lys Ser Leu Val Val	
	65 70 75 80	
70	Glu Ser Asp Ile Pro Val Leu Val Glu Phe Trp Ala Pro Trp Cys Gly	
	85 90 95	

ES 2 384 777 B1

	Pro	Cys	Arg	Met	Ile	His	Pro	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Tyr	
				100					105					110			
5	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Phe	Phe	Lys	Leu	Asn	Thr	Asp	Glu	Ser	Pro	Ser	
			115					120					125				
10	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Gly	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Met	Ile	Phe	
		130					135					140					
15	Lys	Asn	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Ala	Val	Ile	Gly	Ala	Val	Pro	Lys	Ser	
	145					150					155					160	
20	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Ile	Glu	Lys	Phe	Leu							
					165					170							
	<210>	7															
	<211>	339															
	<212>	DNA															
	<213>	Nicotiana tabacum															
25	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(339)															
	<223>	ADN codificante de proteína Trx m madura															
30	<400>	7															
	gaa	gcg	caa	aat	act	gcc	ctt	gaa	gtg	ggt	gct	gtt	aat	gat	aaa	aca	48
	Glu	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Leu	Glu	Val	Gly	Ala	Val	Asn	Asp	Lys	Thr	
	1				5					10					15		
35	tgg	aag	tca	ctt	gtt	gta	gag	tct	gat	ata	cct	gtc	ctg	gtt	gaa	ttt	96
	Trp	Lys	Ser	Leu	Val	Val	Glu	Ser	Asp	Ile	Pro	Val	Leu	Val	Glu	Phe	
				20					25					30			
40	tgg	gct	ccg	tgg	tgt	ggt	cca	tgc	cga	atg	atc	cac	ccg	gtc	att	gat	144
	Trp	Ala	Pro	Trp	Cys	Gly	Pro	Cys	Arg	Met	Ile	His	Pro	Val	Ile	Asp	
			35					40					45				
45	gaa	ctg	gca	aag	gaa	tat	gct	ggc	aag	ctt	aaa	ttc	ttc	aag	ctg	aac	192
	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Phe	Phe	Lys	Leu	Asn	
		50					55					60					
50	acg	gac	gaa	agc	cct	tcc	aca	gca	acc	gaa	ttg	ggg	att	cga	agc	atc	240
	Thr	Asp	Glu	Ser	Pro	Ser	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Gly	Ile	Arg	Ser	Ile	
	65					70					75				80		
55	cca	act	gtg	atg	att	ttc	aag	aat	gga	gag	aag	aaa	gat	gca	gtc	att	288
	Pro	Thr	Val	Met	Ile	Phe	Lys	Asn	Gly	Glu	Lys	Lys	Asp	Ala	Val	Ile	
					85					90					95		
60	ggt	gca	gtt	cct	aaa	tca	aca	cta	acc	acc	tgc	ata	gag	aaa	ttc	ttg	336
	Gly	Ala	Val	Pro	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	Thr	Cys	Ile	Glu	Lys	Phe	Leu	
				100						105					110		
60	taa																339

ES 2 384 777 B1

5 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

 <400> 8

 10 Glu Ala Gln Asn Thr Ala Leu Glu Val Gly Ala Val Asn Asp Lys Thr
 1 5 10 15

 15 Trp Lys Ser Leu Val Val Glu Ser Asp Ile Pro Val Leu Val Glu Phe
 20 25 30

 20 Trp Ala Pro Trp Cys Gly Pro Cys Arg Met Ile His Pro Val Ile Asp
 35 40 45
 Glu Leu Ala Lys Glu Tyr Ala Gly Lys Leu Lys Phe Phe Lys Leu Asn
 50 55 60

 25 Thr Asp Glu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Glu Leu Gly Ile Arg Ser Ile
 65 70 75 80

 30 Pro Thr Val Met Ile Phe Lys Asn Gly Glu Lys Lys Asp Ala Val Ile
 85 90 95

 35 Gly Ala Val Pro Lys Ser Thr Leu Thr Thr Cys Ile Glu Lys Phe Leu
 100 105 110



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130078

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.01.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/02** (2006.01)
C12N15/82 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1609867 A1 (UNIV. FENG CHIA) 25.12.2005, párrafos [0044]-[0047],[0052].	1-11,13-19
A	WO 0250289 A1 (SEMBIOSYS GENETICS INC./SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.) 27.06.2002, página. 14, líneas 11-15, páginas. 56-58; página.67, líneas 13-19.	1-11,13-19
A	WO 2005011367 A1 (UNIV. CENTRAL FLORIDA) 10.02.2005, todo en documento.	1-11,13-19
A	FARRAN, I. et al. "High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potencial therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts". Plant Biotechnol. J. Volumen 6 Issue 5, Páginas 516 - 527. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00334.x. Todo el documento.	1-11,13-19
A	WO 0014239 A2 (DU PONT) 16.03.2000, página. 1, líneas 37-38; página. 11, líneas 31-37; página. 21, líneas 35 en adelante; ejemplo 6.	12
A	WO 2007053183 A2 (UNIV. CENTRAL FLORIDA) 10.05.2007, páginas 109,110, párrafo [0670].	1-11,13-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.05.2011

Examinador
M. Martín-Falquina Garre

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, EPO-Internal, EBI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-19
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
	EP 1609867 A1 (UNIV. FENG CHIA)	25.12.2005
	WO 0250289 A1 (SEMBIOSYS GENETICS INC./SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.)	27.06.2002
	WO 2005011367 A1 (UNIV. CENTRAL FLORIDA)	10.02.2005
	FARRAN, I. et al. "High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potencial therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts". Plant Biotechnol. J. Volumen 6 Issue 5, Páginas 516-527. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00334.x. Todo el documento.	01.04.2008
	WO 0014239 A2 (DU PONT)	16.03.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Los documentos D01 y D02 se consideran los más próximos a la reivindicación 1. D01 se refiere a construcciones y vectores para coexpresar una tioredoxina (Trx) conjuntamente con un segundo polipéptido en plastos de tabaco y D02 divulga construcciones y vectores de expresión que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una tioredoxina y una segunda secuencia que codifica una proteína heteróloga o un enzima. Por otra parte, D03 y D04 divulgan respectivamente sistemas de expresión de albúmina sérica recombinante (HSA) y cardiotrofina-1 humana recombinante (hCT-1) en cloroplastos de tabaco. Sin embargo, ninguno de los documentos citados, considerados aisladamente o en combinación, inducirían al experto en la materia a realizar un sistema de coexpresión en plastos como el de la invención, que permita la expresión de HSA o de hCT-1 con elevado rendimiento sin que se produzca su acumulación en cuerpos de inclusión.

En consecuencia son nuevas e inventivas (arts. 6 y 8 LP) las siguientes reivindicaciones o grupos de reivindicaciones: las reivindicaciones 1-3 que se refieren a vectores para la coexpresión de Trx f con proteínas heterólogas y concretamente con HSA o hCT-1; las reivindicaciones 4 y 5 correspondientes a organismos transformados con dichas construcciones y las reivindicaciones 6-8 que concretan a plantas transgénicas; las reivindicaciones 10 y 11 sobre el método de obtención de dichas plantas y las reivindicaciones 15-17 relativas a el procedimiento para sobreexpresar proteínas heterólogas.

Siguiendo el mismo razonamiento, la reivindicación 13 que se refiere al uso de las plantas transgénicas para la producción de cardiotrofina-1 humana recombinante (hCT-1), la reivindicación 14 sobre la composición farmacéutica que contiene la proteína recombinante y las reivindicaciones 18 y 19 sobre el método para producir proteínas heterólogas biológicamente activas y/o en su conformación nativa, cumplen igualmente los requisitos de novedad y actividad inventiva (Arts. 6 y 8 LP).

El documento D05 se considera el más próximo en relación con la reivindicación 12. Se refiere a un sistema para la sobreexpresión de tioredoxinas en granos de maíz y otros cereales que hace posible mejorar la producción de almidón. La construcción quimérica divulgada facilita la extracción del almidón del grano, pero no se sugiere que provoque su acumulación ni la de sacarosa en el resto de la planta. Por lo tanto la reivindicación 12 también cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Arts. 6 y 8 LP).