



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 343 618**

② Número de solicitud: 200900302

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.02.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

Fecha de la concesión: **08.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **20.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Pistón Pistón, Fernando;**
Martín Muñoz, Antonio;
Barro Losada, Francisco y
Gil Humanes, Javier

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante RNAi.**

㉒ Resumen:

Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante RNAi.

La presente invención se refiere al silenciamiento específico de las α (alfa), β (beta), γ (gamma) y ω (omega)-gliadinas de trigo duro y harinero mediante RNA de interferencia (ARNi) por medio del empleo de un polinucleótido que se transcribe a un hpRNA (hairpin RNA). Además, la presente invención también se refiere a un vector, célula, planta o semilla que comprenden el polinucleótido, cuya expresión se dirige de forma específica en tejidos concretos de las semillas de trigo mediante secuencias reguladoras de la expresión génica como por ejemplo, el promotor de un gen de γ -gliadinas o el promotor del gen que codifica para una D-hordeína.

ES 2 343 618 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante RNAi.

5 La presente invención se refiere al silenciamiento específico de las α (alfa), β (beta), γ (gamma) y ω (omega)-gliadinas de trigo duro y harinero mediante RNA de interferencia (ARNi) por medio del empleo de un polinucleótido que se transcribe a un hpRNA (*hairpin RNA*). Además, la presente invención también se refiere a un vector, célula, planta o semilla que comprenden el polinucleótido, cuya expresión se dirige de forma específica en tejidos concretos de las semillas de trigo mediante secuencias reguladoras de la expresión génica como por ejemplo, el promotor de un gen de γ -gliadinas o el promotor del gen que codifica para una D-hordeína.

Estado de la técnica anterior

15 La interferencia de RNA (RNAi) es un sistema de degradación del RNA mensajero mediado por RNA de doble cadena que permite el silenciamiento específico de determinados genes. Su descubrimiento ha permitido el diseño de vectores compuestos de un promotor y señales de terminación, y entre ellos la secuencia del gen que se desea silenciar, en orientación sentido y antisentido, separados por una secuencia espesadora de longitud variable.

20 Los siRNAs (de las siglas en inglés *small interfering RNA*, o *short interfering RNA*) son moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA de las siglas en inglés *double-stranded RNA*) de 21-25 nucleótidos (nts), que se originan a partir de un dsRNA precursor más largo. Los dsRNAs precursores pueden ser de origen endógeno, en cuyo caso se habla de miRNA (codificados en el genoma del organismo) o de origen exógeno (como virus o transgenes). Tanto siRNA como miRNA son dos tipos de RNAi (RNA de interferencia). El RNAi suprime la expresión post-transcripcional de un determinado mRNA (de las siglas en inglés *messenger RNA*) reconocidos por la secuencia de RNAi.

25 Cuando una célula recibe un dsRNA precursor (los RNA de hebra simple no producen este efecto), que puede generarse a partir de un transgén exógeno, un agente viral o un elemento genético propio, se fragmenta en siRNAs por la acción de una enzima denominada Dicer, una enzima citoplásmica de la familia RNAsa III. Dicer corta el dsRNA en fragmentos de doble cadena de alrededor de 21-25 nucleótidos (siRNA), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del siRNA solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*) mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del siRNA determinan cual de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5', bien porque contenga un mayor contenido en bases AU o bien por apareamientos imperfectos. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional la hebra guía debe ser complementaria al mRNA que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al mRNA complementario de la hebra guía del siRNA presente en el complejo y se produce el corte del mRNA. Posteriormente se produce la degradación de los fragmentos obtenidos. De esta manera, los siRNAs provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de estas secuencias.

40 En trigo, las proteínas del grano, aunque minoritarias (7-18%) respecto a los hidratos de carbono (60-75%), son fundamentales para las propiedades funcionales de la harina. Las principales proteínas del grano son las gluteninas y las gliadinas, que constituyen el gluten. Las gliadinas son responsables del desarrollo de la enfermedad celíaca ya que epítomos (determinantes antigénicos) reconocidos por las células T intestinales han sido identificados en regiones de α y γ -gliadinas (Arentz-Hansen, *et al.*, 2002. *Gastroenterology* 123:803-809). Las personas que sufren la enfermedad celíaca tienen intolerancia al gluten. La intolerancia al gluten se caracteriza por una inflamación crónica de la parte proximal del intestino delgado, causada por la exposición de gliadina. Mediante un trigo que tenga muy disminuido el contenido de gliadinas, se podría elaborar un alimento para celíacos.

50 Se conocen cuatro tipos de gliadina; α (alfa), β (beta), γ (gamma) y ω (omega). La supresión de gliadinas de granos de trigo empleando la tecnología de RNAi se ha venido utilizando en los últimos años. Hasta la fecha, solamente se ha conseguido suprimir una parte de las gliadinas. Por ejemplo, mediante el empleo de construcciones genéticas que dan lugar a RNAi tipo *hairpin* (horquilla), cuya estructura es: Promotor-Secuencia sentido-Espaciador-Secuencia antisentido-Terminador, se han conseguido eliminar gliadinas del tipo α (Folck *et al.*, 2005. XII International Conference on Plant Embryology. Oral presentation) o del tipo γ (Gil-Humanes *et al.* 2008. *Journal of Cereal Science* 48(3):565-568), casi por completo, pero no se han conseguido eliminar todos los tipos de gliadinas de manera eficaz.

60 La obtención de plantas que tengan muy reducida la cantidad de gliadinas en sus semillas presenta dificultades técnicas como son, en primer lugar, el número elevado de genes que codifican para gliadinas y, en segundo lugar, que las plantas de trigo son hexaploides. Conseguir una transformación estable en las plantas de trigo presenta más dificultades que la transformación de cualquier otra planta con menor número de copias del genoma.

Explicación de la invención

65 La presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias donde cada subsecuencia se combina en un orden determinado para dar lugar a una secuencia cuya transcripción a RNA sea capaz de originar un hpRNA (*hairpin RNA*), es decir, un RNA en forma de horquilla, un RNA de doble hebra que será procesado por endoribonucleasas descritas en el estado de la técnica, por mediación de las cuales se generan los siRNA

ES 2 343 618 B1

que producen el silenciamiento post-transcripcional de todos los mRNA (RNA mensajeros) que codifican para todos los tipos de gliadinas de trigo. Para ello, las cuatro subsecuencias son; la secuencia en orientación sentido de las ω -gliadinas, la secuencia en orientación sentido de las α , β y γ -gliadinas y las dos secuencias anteriores en orientación antisentido.

5

Mediante este polinucleótido, cuya expresión se dirige de forma específica en tejidos concretos de las semillas de trigo mediante secuencias reguladoras de la expresión génica como por ejemplo, el promotor de un gen de γ -gliadinas o el promotor del gen que codifica para una D-hordeína, se consigue el silenciamiento post-transcripcional de todos los genes de especies de trigo blando y de especies de trigo duro de manera eficaz y sinérgica, ya que se consiguen silenciar más cantidad de genes de gliadinas cuando se comparan con los resultados de silenciamiento de α y γ -gliadinas mediante hpRNA que se describen en el estado de la técnica. Ello se debe fundamentalmente al diseño específico de las subsecuencias en orientación sentido y antisentido cuyos siRNA generados hibridan con todos los mRNA de las α , β , γ y ω -gliadinas de trigo en combinación con promotores de las gliadinas con niveles de expresión más elevados, inducibles en tejidos específicos de la semilla de trigo. Este diseño se ha llevado a cabo mediante la identificación de grupos de gliadinas que contienen epítomos reconocidos por las células T humanas, de modo que el silenciamiento de las proteínas que los contienen da lugar a semillas de trigo con las que se pueden obtener productos aptos para personas que presentan alergia al gluten.

En la presente invención se emplean los términos DNA o RNA para referirse al ácido desoxirribonucleico o al ácido desoxirribonucleico respectivamente.

20

En este sentido, un aspecto de la presente invención es un polinucleótido con al menos un 90% de identidad con respecto a una secuencia que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde:

25

- a. las secuencias a1, a2, b1 y b2 son diferentes entre sí y se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, de la siguiente forma:
- b. si a1 es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4, b1 es SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 1 y a2 es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y
- c. si a1 es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, b1 es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 2 y a2 es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.

30

35

Otro aspecto de la presente invención es un polinucleótido que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde las secuencias a1, a2, b1 y b2 se describen en los apartados (a) a (c) del aspecto anterior.

40

Las secuencias a1-a2 y b2-b1 (en adelante, pares de secuencias de la invención), están unidas formando una secuencia lineal y continua de nucleótidos, a su vez, ambos pares están unidos entre sí por medio de una secuencia espaciadora cuya longitud es de al menos un nucleótido. Preferiblemente la secuencia espaciadora es una secuencia no codificante que es eliminada tras el procesado del dsRNA formado. La secuencia espaciadora puede ser parte de una secuencia de un intrón de un gen. La función de la secuencia espaciadora es actuar de bisagra de los pares de secuencias descritos para que se pueda producir el apareamiento o hibridación de las secuencias de RNA codificadas por el polinucleótido.

45

El polinucleótido tiene, al menos, un 90% de identidad con la secuencia que comprende los pares de secuencias de la invención. De este modo se contemplan las modificaciones en alguno de los nucleótidos que constituyen los pares de secuencias, hasta llegar a un porcentaje de un 90% de identidad con respecto a la secuencia original, cuya composición nucleotídica se ha definido en este aspecto.

50

SEQ ID NO: 1 es la secuencia en orientación sentido que contiene parte del fragmento que codifica los epítomos de ω -gliadinas reconocidos por las células T humanas que dan lugar a una respuesta inmune en personas que padecen enfermedad celíaca. SEQ ID NO: 2 es la secuencia en orientación sentido que contiene parte del fragmento que codifica los epítomos de α , β , y γ -gliadinas. SEQ ID NO: 3 es la secuencia antisentido de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 es la secuencia antisentido de SEQ ID NO: 1.

55

El polinucleótido de la invención da lugar a un RNA donde los dos pares de secuencias hibridan entre sí formando una horquilla. Por tanto, según estos dos primeros aspectos de la presente invención, las combinaciones de secuencias mediante las cuales pueden obtenerse horquillas de RNA se representan en la tabla 1 y en la tabla 2:

60

65

ES 2 343 618 B1

TABLA 1

Combinaciones de secuencias donde los pares a1-a2 y b2-b1 son secuencias sentido o antisentido

Combinaciones	a1	a2	b2	b1
1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3
3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
4	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 1

TABLA 2

Combinaciones de secuencias donde los pares a1-a2 y b2-b1 contienen secuencias sentido y antisentido

Combinaciones	a1	a2	b2	b1
1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4
2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2
3	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3
4	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 1

En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde a1 es SEQ ID NO: 1, a2 es SEQ ID NO: 2, b2 es SEQ ID NO: 3 y b1 es SEQ ID NO: 4.

Según otra realización preferida, el polinucleótido comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) donde la secuencia espaciadora es SEQ ID NO: 5. La secuencia SEQ ID NO: 5 es un fragmento de un intrón del gen *Ubi1* que codifica para la Ubiquitina de maíz. Un intrón es una región del DNA que es eliminada del transcrito primario de RNA mediante un proceso que se denomina *splicing*, es decir, el intrón no codifica para ninguna secuencia de una proteína. La ubiquitina es una proteína cuya función es la de marcar otras proteínas para su destrucción.

Otra realización preferida es un polinucleótido que además comprende una secuencia reguladora de la expresión génica unida funcionalmente a su extremo 5'. En la presente invención, el término "secuencia reguladora de la expresión génica" hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad del gen en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de una secuencia de DNA o al inicio de traducción de una secuencia de RNA u otras secuencias no descritas. A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones. La secuencia reguladora se une al extremo 5' del polinucleótido de la presente invención de forma funcional, es decir, que es capaz de dirigir la expresión del polinucleótido con una intensidad y localización que dependen de la propia secuencia reguladora.

Según una realización más preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica es SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 7. La secuencia SEQ ID NO: 6 corresponde con la secuencia de un promotor del gen γ -gliadina que presenta una duplicación en una caja prolina. SEQ ID NO: 7 corresponde con la secuencia de un promotor del gen D-Hordeína (la secuencia nucleotídica de este gen tiene un número de acceso AY998009 y pertenece a la especie *Hordeum chilense*). Ambos promotores se expresan en el endospermo de las semillas.

También se contemplan las secuencias complementarias de cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención.

En adelante, para referirse a cualquiera de los polinucleótidos anteriores, se usará el término "polinucleótidos de la invención" o "polinucleótidos de la presente invención".

Otro aspecto de la presente invención es una secuencia de RNA, codificada por cualquiera de los polinucleótidos de la invención, capaz de formar un hpRNA donde la secuencia codificada por el par a1-a2 híbrida completamente con la secuencia codificada por el par b2-b1.

ES 2 343 618 B1

Un hpRNA (del inglés *hairpin RNA*) es una horquilla formada por la hibridación de las secuencias transcritas. En la presente invención, para la síntesis de las secuencias transcritas se ha usado como molde el polinucleótido de la invención donde los pares de secuencias a1-a2 y b2-b1 hibridan completamente entre sí, tal como se observa en la figura 1B. Un hpRNA es un RNA de doble hebra (dsRNA) que es cortado por una endoribonucleasa, por ejemplo, la endoribonucleasa Dicer, dando como resultado fragmentos de alrededor de 21-25 nts. Estos fragmentos se conocen como siRNA. Tal como se ha descrito anteriormente, los siRNAs provocan el silenciamiento post-transcripcional de las secuencias nucleotídicas diana, de forma que no se obtiene la proteína resultante de la expresión de las secuencias de mRNA.

Un aspecto más de la presente invención es al menos un siRNA generado a partir de la secuencia del hpRNA según el aspecto anterior. El siRNA también se puede denominar RNAi. El siRNA es un RNA de doble hebra de entre 21 y 25 nucleótidos, pero sin limitarse a este número de nucleótidos, que se genera a partir de la secuencia del hpRNA de la invención. En la presente invención, al definir el número de nucleótidos aproximado (de alrededor de 21 y 25 nucleótidos) del siRNA se entiende que hay otra hebra complementaria a esa secuencia, es decir, que se puede hablar indistintamente de nucleótidos o pares de bases (pb).

Como se ha descrito, la enzima Dicer corta el dsRNA en fragmentos de doble cadena de alrededor de 21-25 nucleótidos (siRNA), con el extremo 5' fosforilado y dos nucleótidos sobresaliendo, sin aparear, en el extremo 3'. De las dos cadenas del siRNA solo una, denominada hebra guía, se incorpora en el complejo enzimático RISC mientras que la otra hebra se degrada. Las características termodinámicas del extremo 5' del siRNA determinan cual de las dos hebras se incorpora al complejo RISC. Normalmente se incorpora como hebra guía aquella con menor estabilidad en el extremo 5'. Para que se produzca el silenciamiento post-transcripcional, la hebra guía debe ser complementaria al mRNA que se pretende silenciar. A continuación, el complejo RISC se une al mRNA complementario de la hebra guía del siRNA presente en el complejo y se produce el corte del mRNA.

Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En adelante, "vector de la invención" o "vector de la presente invención".

El término "vector" se refiere a un fragmento de DNA que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de DNA que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de DNA que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector comprende el polinucleótido de la invención que fusionado al mismo puede replicarse en el huésped correspondiente. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

Un aspecto más de la presente invención es una célula aislada transfectada con el vector de la invención. En adelante, "célula de la invención" o "célula de la presente invención". El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un DNA ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli* o una bacteria capaz de transferir el DNA de interés al interior de una planta como por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino *Plantae*. Así pues, en el caso de que la célula sea vegetal, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

El término "transfección" hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transfección para métodos no-virales es usado en referencia a células eucarióticas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas. En el caso de la presente invención, el término transfección es equivalente al término transformación.

Otro aspecto de la presente invención es una planta modificada genéticamente que comprende la célula de la invención. El término "planta" engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación, así como el germoplasma. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o por los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo (ver más adelante semillas, propágulos o progenie). La planta debe comprender la célula de la presente invención de forma que se exprese en un tejido específico (en un momento concreto del desarrollo vegetativo o dependiendo de las condiciones ambientales en donde se desarrolla) o de forma constitutiva o de forma ectópica (que se expresa en otras células o tejidos diferentes de las habituales y esperadas).

La planta de la invención puede contener el polinucleótido de la invención en homocigosis, heterocigosis o hemi-cigosis.

Según una realización preferida, la planta pertenece al género *Triticum*. La planta se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Triticum aestivum*, *T. aethiopicum*, *T. araraticum*, *T. boeoticum*, *T. carthlicum*, *T. compactum*, *T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. ispahanicum*, *T. karamyshevii*, *T. macha*, *T. militinae*, *T. monococcum*,

ES 2 343 618 B1

T. polonicum, *T. repens*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. timopheevii*, *T. turanicum*, *T. turgidum*, *T. urartu*, *T. vavilovii* o *T. zhukovskyi*.

5 Según otra realización preferida, la planta es de la especie *Triticum aestivum* o *Triticum turgidum*. Según otra realización preferida la planta pertenece al cultivar Bobwhite o al cultivar Don Pedro. Más preferiblemente se seleccionan los cultivares BW208 y BW2003 (Bobwhite) que pertenecen a la especie de trigo *Triticum aestivum* L. ssp *aestivum* y la variedad Don Pedro pertenece a la especie de trigo *Triticum turgidum* L. ssp *durum*.

10 Bobwhite es el nombre del cultivar, obtenido en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). BW208 y BW2003, son diferentes líneas de Bobwhite. Don Pedro es una variedad de trigo duro también del CIMMYT. Bobwhite y Don Pedro son variedades públicas.

15 La planta de la invención puede conseguirse por transformación genética de células vegetales mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración del polinucleótido de la invención en el DNA de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial seguida, aunque no necesariamente, de un programa de regeneración *in vitro* adecuado a las características y necesidades de la especie vegetal transformada. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga el polinucleótido de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan el polinucleótido de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo, por ejemplo, se podría llevar a cabo la transformación genética de células germinales de espigas tal como se ha mencionado pero sin necesidad de tener que regenerar una planta posteriormente (ver más adelante). Asimismo también se incluye la planta que comprende la célula de la presente invención de forma estable o de forma transitoria.

25 Otro aspecto de la presente invención es una semilla que procede de cualquiera de las plantas de la invención. En adelante, “semilla de la invención” o “semilla de la presente invención”.

30 Un aspecto más de la presente invención es un grano de polen, propágulo, progenie o parte de la planta que procede de cualquiera de las plantas de la invención.

35 En la presente invención se tiene en cuenta el polen como transmisor de los caracteres genéticos y fenotípicos, que puede llevarse a cabo por la polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende el polinucleótido de la presente invención y, tras los respectivos cruces y/o selecciones, se puede obtener una planta en la que la secuencia está integrada de forma estable (aunque también pueden expresarse de forma transitoria) y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

40 Los propágulos son partes de la planta que permiten la propagación o reproducción asexual en vegetales, por la que se obtienen nuevas plantas u órganos individualizados. Los tejidos de la porción separada deben recuperar la condición de meristemas para producir todo el conjunto de órganos de la planta. El propágulo se selecciona, pero sin excluir, de la lista que comprende estolones, rizomas, tubérculos o bulbos.

45 El término “progenie” hace referencia al resultado de la reproducción, es decir, el individuo o individuos producidos mediante la intervención de uno o más individuos parentales. Por ejemplo, la progenie de las plantas, obtenida mediante reproducción sexual, son las semillas, sin embargo la progenie de una planta puede ser cualquier célula resultante de la fusión de cualquier contenido celular, plasto, compartimento celular, DNA o cualquiera de sus combinaciones. En los procesos de división celular (como por ejemplo en el cultivo *in vitro*) la progenie son las células resultantes de la división.

50 Otro aspecto de la presente invención es el uso del polinucleótido, vector o célula de la invención para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.

55 Tal como se demuestra en el ejemplo 2 de la presente invención, la integración del polinucleótido de la invención en el genoma de plantas de trigo de dos genotipos de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.); cultivar Bobwhite (BW208 y BW2003), y uno de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*); cultivar Don Pedro, produce el silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas de las semillas de plantas transformantes (Fig. 3, Fig. 4 y Fig. 5).

60 Un aspecto más de la presente invención es el uso de la semilla de la invención para preparar una composición alimenticia (en adelante “composición de la invención” o “composición de la presente invención”). La composición alimenticia se prepara, por ejemplo, pero sin limitarse, a partir de la harina y/o sémola de las semillas de la invención en combinación o no con otras harinas y/o sémolas, u otros compuestos.

65 El término “harina” según se entiende en la presente invención, es el producto obtenido de la molturación de cualquier semilla de plantas del género *Triticum* despojado en mayor o menor grado del salvado o la cascarilla de la semilla.

ES 2 343 618 B1

El término “sémola” hace referencia a la harina gruesa (semillas de trigo poco molidas), es decir, fragmentos de endospermo con una cantidad variable de cascarilla de semilla.

5 El alimento preparado se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende pan, productos de bollería, productos de pastelería, productos de repostería, pasta alimenticia, masa alimenticia, cereales, bebidas o lácteos.

Otro aspecto de la invención es el uso de la composición de la invención para preparar un alimento funcional, complemento vitamínico o complemento nutricional. Tal como se entiende en la presente invención, un alimento funcional cumple una función específica como puede ser la de mejorar la dieta de las personas que lo consumen. Para
10 ello al alimento funcional se le puede agregar un complemento vitamínico y/o complemento nutricional.

El alimento que comprende la composición alimentaria de la presente invención puede ser consumido incluso por personas que tienen alergias al gluten, es decir, que padecen la enfermedad celiaca.

15 Un aspecto más de la presente invención es un método para la obtención de la planta de la invención, que comprende:

- a. Seleccionar una parte de la planta,
- 20 b. transfectar las células de la parte de la planta del apartado (a) con el vector según la reivindicación 9,
- c. seleccionar la célula transfectada del apartado (b) que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- 25 d. regenerar al menos una planta procedente de la célula seleccionada en el apartado (c),
- e. seleccionar una o varias plantas regeneradas según el apartado (d) donde el polinucleótido se transcribe a un hpRNA,
- 30 f. seleccionar una o varias plantas obtenidas según el apartado (e) que presentan silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.

En el caso de las plantas de trigo se selecciona preferiblemente el escutelo para ser transfectado por el vector de la invención. La inserción del polinucleótido de la presente invención en un vector se puede llevar a cabo por medio de
35 los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte del polinucleótido y el vector con enzimas de restricción (digestión) y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre el polinucleótido de la invención. El vector ha sido definido en un párrafo anterior.

La selección del vector que comprende la secuencia de la invención escogida, puede llevarse a cabo mediante técnicas como;

- Selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector.
45

- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento de alguna de las secuencias de la invención insertada en el vector.

La célula se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*)
50 o tejido vegetal.

La transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, electroporación, transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el
55 DNA de la célula. Preferiblemente la transformación se lleva a cabo por medio de biolística. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose. También se incluyen las células que comprenden cualquiera de las secuencias de la invención de forma transitoria.

La célula transformada con un vector que incluye cualquiera de los polinucleótidos de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los DNA de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, en este caso se suele insertar el DNA, que contiene, entre otras secuencias, el polinucleótido de la invención. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos o herbicidas está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del DNA del vector. También se puede seleccionar la célula que comprende el polinucleótido de la invención mediante
65 cualquier otra técnica que permita discriminar su presencia o ausencia y/o su expresión.

Las células vegetales seleccionadas, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede. Esto es posible gracias a que las células vegetales son totipotentes, es decir, mediante la combinación hormonal adecuada se las puede desdiferenciar y originar células embrionarias, que al contener una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenecen, tienen el potencial para regenerar una nueva planta completa. Además son necesarias condiciones de luz y temperatura idóneas para cada especie vegetal. Una vez que se ha regenerado la planta procedente de una célula vegetal seleccionada, se puede llevar a cabo un análisis de la presencia y/o de la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para el polinucleótido de la invención o de cualquier otra secuencia de la presente invención (secuencia promotora, etc.).

El método comprende, además, la selección de una planta que presenta un silenciamiento sustancial de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas. Preferiblemente se seleccionan las plantas que presentan un silenciamiento casi completo o completo de todas las gliadinas de las semillas. La reducción del contenido total de gliadinas respecto de una planta control (planta que no comprende el polinucleótido de la invención) es mayor o igual del 90%. Preferiblemente las plantas control no contienen el polinucleótido de la invención en la célula vegetal. El control también puede ser una planta tipo salvaje antes de ser transformadas, que ha pasado por los mismos pasos de cultivo *in vitro* que las plantas de la invención o que no ha pasado por estos pasos de cultivo.

Las células transfectadas pueden ser células germinales de la espiga de la planta y, en este caso, se regeneraría al menos una planta procedente de las semillas generadas por la citada espiga de la planta y se seleccionaría al menos una planta que presente silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripcion de las figuras

Fig. 1. Muestra la estructura del polinucleótido de la invención.

La figura A muestra un polinucleótido que comprende los pares de secuencias a1-a2 y b2-b1, separados por una secuencia espadadora (E) y cuya expresión está dirigida por una secuencia reguladora de la expresión génica (R).

La figura B muestra el hpRNA resultante de la transcripción del polinucleótido representado en la figura A en el que se forma una horquilla donde las secuencias Sec a1, a2, b2 y b1 hibridan tal como se describe. Posteriormente, este RNA es procesado, produciéndose una nueva secuencia de RNA de doble hebra (dsRNA). El último paso representado se refiere al fraccionamiento de la secuencia anterior por medio de enzimas como por ejemplo la enzima Dicer de modo que se forman secuencias de RNA de doble hebra de unos 21-25 nucleótidos, llamados siRNA (*small interfering RNA*).

Fig. 2. Muestra un ejemplo concreto del polinucleótido de la invención.

En este caso, la secuencia R es una secuencia promotora del gen de gamma-gliadina (γ -Gliadina) o de D-Hordeína. La secuencia E es un fragmento de un intrón del gen de la Ubiquitina de maíz. NOST es una secuencia terminadora de la transcripción. Este polinucleótido se inserta, en este ejemplo concreto, en un vector pUC18 que tiene un gen de resistencia a ampicilina (APr).

Fig. 3. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo BW208, por las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF, transformadas con el polinucleótido de la invención.

La figura A muestra la separación mediante A-PAGE de las gliadinas de la muestra de semillas de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW208 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ (B377-2-3). Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

La figura B muestra un análisis de gliadinas por MALDI-TOF de una muestra de semillas de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW208 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$. En la gráfica correspondiente a la línea control se indican las diferentes fracciones de alfa (α), beta (β), gamma (γ) y omega (ω)-gliadinas. El eje X representa la relación (m/z) entre la masa de un ión dado (m) y el número de protones que contiene (z).

Fig 4. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo BW2003, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea de trigo harinero control (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) variedad BW2003 y una línea de trigo harinero del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$. Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

ES 2 343 618 B1

Fig. 5. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de trigo duro Don Pedro, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

5 Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea de trigo duro control (*Triticum turgidum* L. ssp *durum*) variedad Don Pedro y una línea de trigo duro del mismo genotipo transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$. Se indican los grupos de gliadinas que se obtienen en la separación.

Fig. 6. Muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas de la variedad de BW208, por la técnica A-PAGE, transformadas con el polinucleótido de la invención.

10 Separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea control BW208 y tres semillas de una línea (B382-4-1) del mismo genotipo transformada con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$. Se indican los grupos de gliadinas. Nótese que el promotor que contiene este vector es promotor D-Hordeína (SEQ ID NO: 7).

15 Fig. 7. Muestra el análisis por Western Blot de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) transformadas con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$.

20 A: Las gliadinas de tres granos de la línea B382-4-1, denotados como I1, I2, I3, del genotipo BW208 se han separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.

B: Las gliadinas de dos granos de la línea B374-6-2, denotados como O2 y O3, del genotipo BW2003 se han separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.

25 Los números a la izquierda de A indican el peso molecular en KDa tanto para A como para B.

Fig. 8. Muestra el análisis por Western Blot de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) de la variedad BW208 transformadas con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$.

30 Las gliadinas de tres granos de la línea transgénica B375-3-1, denotados como A1, A2, A3 y las gliadinas de dos granos de trigo de la línea transgénica B377-2-3, denotados como C1 y C2, ambas del genotipo BW208 se han separado en geles SDS e hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 específico de gluten.

Los números a la izquierda de la figura indican el peso molecular en KDa.

35 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la construcción del polinucleótido de la invención, la generación de plantas de trigo de 3 variedades distintas transformadas con el vector de la invención y los análisis del contenido de gliadinas por las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF.

40 Ejemplo 1

Construcción de los vectores pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ y pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$

45 1.1 Síntesis de las secuencias $\alpha/\beta/\gamma$ y ω -gliadinas

Las secuencias de ADN depositadas en el *Genebank* pertenecientes a $\alpha/\beta/\gamma$ y ω -gliadinas de trigo se alinearon por separado y se identificaron las regiones que presentaban un mayor grado de homología. A partir de estos alineamientos se seleccionó una secuencia de 170 pb de $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadinas y otra de 191pb de ω -gliadinas y se diseñaron los cebadores Alpha_hp-F (SEQ ID NO: 8) y Alpha_hp-R (SEQ ID NO: 9) para la amplificación del fragmento $\alpha/\beta/\gamma$ y los cebadores Omega_III-F (SEQ ID NO: 10) y Omega_III-R (SEQ ID NO: 11) para la amplificación del fragmento ω (Tabla 1). Las condiciones de PCR para ambos fragmentos fueron: cDNA de *T. aestivum* cv Bobwhite sintetizado a partir de 50 ng de RNA total extraído de granos inmaduros, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada cebador, 1x buffer y 0,625 unidades de una mezcla de polimerasas en una relación 100:1 de *Tth* (*Thermus thermophilus*) y *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) (*BIOTOOLS*, Madrid, España) en una reacción final de 25 μ l. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg y 72°C 30 seg; y una extensión final de 72°C 4 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (*Applied Biosystems*). Los productos de cada PCR se purificaron utilizando el *GFX PCR DNA Purification Kit* (*Amersham Biosciences, Amersham, UK*) y fueron secuenciados por la empresa Secugen SL. Para conseguir el solapamiento de los fragmentos α/β y ω se volvió a amplificar el fragmento de ω -gliadinas utilizando un cebador solapante (Omega III R solapante (SEQ ID NO: 12) junto con el cebador directo SEQ ID NO: 10) y el fragmento α/β -gliadinas utilizando otro cebador solapante Alfa F solapante (SEQ ID NO: 13) junto con el cebador reverso SEQ ID NO: 9) que añadían a cada fragmento 12 pares de bases complementarias al otro fragmento. Mediante estas últimas amplificaciones se obtuvieron dos fragmentos que complementan entre el extremo 3' del fragmento de ω -gliadinas y el extremo 5' del fragmento $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadinas. Las condiciones de las PCRs fueron las mismas que las descritas anteriormente; el producto de éstas se separó en un gel de agarosa 1% y la banda correspondiente a cada fragmento se purificó con el *QUIAquick Gel Extraction Kit* (*QUIAGEN Inc., Valencia, CA*). La PCR solapante final se llevó a cabo utilizando 10 ng del fragmento $\alpha/\beta/\gamma$ solapante purificado, 10 ng del fragmento ω solapante purificado, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M del cebador alpha_hp-F, 0,2 μ M

ES 2 343 618 B1

del cebador omega_III-R, 1x buffer y 0,625 unidades de una mezcla 100:1 de *Tth/Pfu* polimerasas en una reacción final de 50 μ l. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 57°C 30 seg y 72°C 30 seg; y una extensión final de 72°C 4 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (Applied Biosystems). El producto de PCR se separó en un gel de agarosa 1% y la banda que presentaba el tamaño correspondiente al fragmento $\omega/\alpha/\beta$ (361 pb) se purificó con el *QUIAquick Gel Extaction Kit* (QUIAGEN Inc., Valencia, CA) y se clonó en el plásmido TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido contiene los sitios *attL1* y *attL2* que permiten la transferencia mediante recombinación del gen de interés en cualquier vector *Gateway*® que contenga los sitios *attR1* y *attR2*.

1.2 Obtención de los vectores de transformación *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* y *pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$*

El vector de transformación se sintetizó utilizando el vector puc18 (2616 pb). Los distintos fragmentos que componen el vector de transformación *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* se fueron introduciendo uno a uno en el sitio de clonación múltiple del vector puc18. El fragmento Nost (272 pb) se extrajo del vector pANDA- β mediante restricción con la enzima EcoRI y se introdujo en el puc18, dando lugar al puc18_Nost. Seguidamente se extrajo el fragmento *attR*sense_GUS_attRantisense (4,4 kb) del vector pANDA mediante la restricción combinada con las enzimas Sacl y KpnI y se introdujo en el vector puc18_Nost dando lugar al puc18_attR_GUS_Nost. Este fragmento contenía los sitios *attR1* y *attR2* en sentido y antisentido separados por una secuencia de unión de 1 kb (gus linker). Esta secuencia gus linker fue sustituida por el fragmento Ubi intrón (1019pb), previamente clonado en nuestro laboratorio, mediante restricción con la enzima EcoRV dando lugar al plásmido puc18_attR_Ubi_Nost. Finalmente el promotor de gliadinas (885 pb) fue introducido mediante restricción doble con las enzimas SphI y XhoI dando lugar al plásmido puc18_Gli_attR_Ubi_Nost.

El promotor del gen D-hordeína (836 pb) fue introducido también mediante restricción doble con las enzimas SphI y XhoI dando lugar al vector puc18_D_attR_Ubi_Nost. La diferencia entre los vectores *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* y *pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* es que el primero contiene el promotor de γ -gliadinas de trigo y el segundo contiene el promotor de H-hordeína de trigo.

El siguiente paso fue la introducción del fragmento $\omega/\alpha/\beta$ en los plásmidos puc18_Gli_attR_Ubi_Nost y puc18_D_attR_Ubi_Nost. El plásmido TOPO+ $\omega/\alpha/\beta$ contenía los sitios *attL1* y *attL2* mientras que los plásmidos puc18_Gli_attR_Ubi_Nost y puc18_D_attR_Ubi_Nost contenían los sitios *attR1* y *attR2* en sentido y antisentido separados por el intrón Ubi. Esto permitió realizar una reacción de recombinación LR utilizando el kit *Gateway*® LR *Clonase TM Enzyme Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado fue la introducción del fragmento $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ en sentido y en antisentido separados por el intrón Ubi y dentro de la estructura de los plásmidos puc18_Gli_attR_Ubi_Nost y puc18_D_attR_Ubi_Nost. Los vectores resultantes se denominaron *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* y *pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* (Fig. 2) y fueron introducidos mediante transformación en células competentes de *E. coli* (DH5 α) para su posterior multiplicación.

Ejemplo 2

Obtención de líneas transgénicas de trigo

La transformación genética se llevó a cabo mediante biolística, utilizando el sistema de aceleración de las partículas mediante presión de helio (PDS1000/HeTM, BIORAD, Hercules, CA). Se utilizaron dos genotipos de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) cultivar Bobwhite (BW208 y BW2003) y uno de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp *durum*) cultivar Don Pedro para el aislamiento de escutelos de embriones inmaduros. El aislamiento se llevó a cabo en un ambiente de esterilidad a partir de granos de trigo inmaduros recogidos 12-16 días después de la antesis, previamente esterilizados mediante inmersión durante 3 min en una solución de etanol 70%, 10 min en una solución de hipoclorito sódico 20% y dos enjuagues con H₂O destilada estéril. Para la transformación genética se utilizaron partículas de oro de 0,6 μ m de diámetro y se mezclaron 1,5 pmoles/mg oro del vector *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* o del vector *pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* y 0,5 pmoles/mg oro del vector pAHC25 (Christensen *et al.*, 1996. *Transgenic Research* 5, 213-218). Las condiciones de cada disparo fueron: 91,4 KPa (27 inHg) de presión de vacío 7,584 MPa (1100PSI) de presión de disparo, 6 cm de distancia de disparo, 60 μ g de la mezcla de oro y plásmidos por disparo.

La cotransformación con el plásmido pAHC25 que contiene el gen *bar* de selección (resistencia a fosfonotricina) y el gen *uidA* (síntesis de β -glucuronidasa) permitió la selección de los tejidos transformados en medios con 4 mg/l de fosfonotricina (PPT) y la posterior identificación de los transgénicos mediante el ensayo de la β glucuronidasa (GUS) de acuerdo al protocolo descrito por Jefferson (1987, *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405). Los medios, el proceso de cultivo *in vitro* y la regeneración de plantas se llevó a cabo según Barro *et al* (Barro *et al.*, 1998. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 684-695).

Las plantas regeneradas en cultivo *in vitro* se sembraron en tierra y se les realizó el ensayo GUS como tal y como se describe en el párrafo anterior. A las plantas que dieron un resultado positivo en el ensayo GUS se les extrajo DNA utilizando *DNAzol reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó una PCR para confirmar la presencia de los plásmidos *pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* , *pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$* y pAHC25 en el genoma de la planta adulta. Las condiciones de PCR fueron: 100 ng de DNA extraído de hojas jóvenes, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada cebador, 1x buffer y 0,625 unidades de polimerasa *Tth* (BIOTOOLS, Madrid, España). Los cebadores utilizados fueron prGliF (SEQ ID NO: 14) y Omega_III_R solapante (SEQ ID NO: 12) para el plásmido *pGhp-*

ES 2 343 618 B1

$\omega/\alpha/\beta/\gamma$, prHorDF (SEQ ID NO: 15) y Omega_III_R solapante (SEQ ID NO: 12) para el plásmido pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ y BAR_F (SEQ ID NO: 16) y BAR_R (SEQ ID NO: 17) para el pAHC25 (Tabla 3). Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un paso inicial de 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 55°C 30 seg y 72°C 2 min; y una extensión final de 72°C 7 min en un termociclador *GeneAmp PCR system 9700* (*Applied Biosystems*). El producto de cada PCR se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% y las líneas positivas se seleccionaron para su posterior análisis.

TABLA 3

Cebadores y secuencias utilizados

cebador	secuencia 5' a 3'
Alpha_hp_F	(SEQ ID NO: 8)
Alpha_hp_R	(SEQ ID NO: 9)
Omega_III_F	(SEQ ID NO: 10)
Omega_III_R	(SEQ ID NO: 11)
Omega_III_R solapante	(SEQ ID NO: 12)
Alpha_F_solapante	(SEQ ID NO: 13)
prGli_F	(SEQ ID NO: 14)
prHorDF	(SEQ ID NO: 15)
BAR_F	(SEQ ID NO: 16)
BAR_R	(SEQ ID NO: 17)

Ejemplo 2

Extracción de gliadinas y análisis MALDI/TOF y A-PAGE

Las semillas de las líneas positivas se machacaron en un mortero hasta obtener harina. A continuación la harina se lavó con 1 ml de una solución de 0,5 M de NaCl durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) en un agitador y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con agua destilada durante 15 min a TA también en agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min, desechándose el sobrenadante. Las gliadinas se extrajeron del precipitado con una solución acuosa de etanol al 60% (v/v) en una relación 5:1 (μ l etanol/mg harina) y agitación durante 45 min a TA. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm y el sobrenadante que contenía las gliadinas se recogió en tubos nuevos. Una fracción del extracto se utilizó para identificación de gliadinas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y otra fracción se separó por electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida (A-PAGE). Para el análisis MALDI, a 5 μ l del extracto de gliadinas se le añadió 2 μ l de una solución 50 mM octyl- β -D-glucopyranoside (ODGP) y 25 μ l de ácido sinapínico saturado en una solución acuosa al 30% (v/v) de acetonitrilo que contenía 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) que se usa como solución matriz. La mezcla se secó en una centrifugadora *Speed-Vac* durante 15 min y el residuo se disolvió en 6 μ l de una solución acuosa de etanol al 60% (v/v) que contenía TFA al 0,1%. La mezcla se colocó en un portamuestras de acero inoxidable y se dejó secar durante 5 min a TA. Las muestras se analizaron en un MALDI-TOF *Voyager DE-PRO* (*PE Biosystems*) en la configuración estándar del instrumento. Los espectros se registraron en el modo lineal positivo a una aceleración de voltaje de 25 kV con una rejilla de voltaje del 93% y 700 nanosegundos de retardo. Se acumularon 200 espectros del láser para construir los perfiles de gliadinas.

Las gliadinas se separaron en geles A-PAGE siguiendo los protocolos estándares descritos por (Khan *et al.*, 1985. *Cereal Chemistry* 62: 310-313).

Se llevó a cabo la hibridación (Western blot) de las gliadinas separadas en los geles SDS-PAGE con el anticuerpo R5 (Valdez *et al.* 2003, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:465-474), ya que éste es el método oficial reconocido por el Codex Alimentarius para la detección de gluten en alimentos.

Los análisis en geles A-PAGE y MALDI-TOF mostraron que la combinación de esta secuencia híbrida es altamente eficaz en el silenciamiento de gliadinas de trigo.

En la Fig. 3 se muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas del cultivar de trigo BW208, transformadas con el polinucleótido de la invención, por medio de las técnicas A-PAGE y MALDI-TOF. En la Fig. 3A se observa la atenuación de las bandas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-

ES 2 343 618 B1

gliadinas procedente de semillas de una línea de trigo harinero transformada con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ (B377-2-3) cuando se compara con el cultivar BW208 de trigo control de la que procede (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*). En la Fig. 3B se observa el perfil de expresión del espectro que corresponde con las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas, donde cada uno de los picos corresponde con una proteína diferente. En la gráfica se señalan los picos que corresponden con cada uno de los tipos de gliadina. Tal como se observa en los perfiles de expresión correspondiente a plantas control y en los perfiles de expresión de las plantas transformadas con el polinucleótido de la invención, la supresión de los picos correspondientes a cada una de las gliadinas que se observan en el perfil de las plantas control, es muy notoria, demostrándose de este modo la eficacia del polinucleótido y del método de la presente invención en el silenciamiento post-transcripcional de las gliadinas presentes en los granos de trigo pertenecientes a este cultivar.

En las Fig. 4 y 5 se muestra la separación e identificación de gliadinas de semillas de plantas del cultivar de trigo BW2003 (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) y de la variedad Don Pedro (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) respectivamente, transformadas con el polinucleótido de la invención, por medio de la técnica A-PAGE. En ambos casos se observa la atenuación de las bandas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas procedente de las semillas de las líneas de trigo transformadas con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ (B377-2-3) cuando se compara con sus respectivos controles.

En la Fig. 6 se muestra la separación de gliadinas en geles A-PAGE de una línea control BW208 y tres semillas de una línea (B382-4-1) del mismo genotipo transformada con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$. El promotor que contiene este vector es el promotor de un gen D-Hordeína (SEQ ID NO: 7). Se observa la atenuación de las bandas en las semillas de las líneas transgénicas que corresponde con cada una de las alfa, beta, gamma y omega-gliadinas de trigo.

En la Fig. 7 se muestra el análisis por Western Blot de dos líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) transformadas con el vector pDhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$ que contiene el promotor codificado por la secuencia SEQ ID NO: 7.

En el gel A se muestra la separación de gliadinas en geles SDS-PAGE de tres granos de trigo (I1, I2 e I3) de la línea transgénica B382-4-1. En el gel B se muestra la separación de gliadinas de dos granos de trigo (O2 y O3) de la línea transgénica B374-6-2. Posteriormente ambos geles se han hibridado con el anticuerpo monoclonal R5 que reconoce péptidos que son potencialmente tóxicos para los celíacos. El anticuerpo monoclonal R5 es el método oficial reconocido por el Codex Alimentarius para la detección de gluten en alimentos.

En la Fig. 7A no se observa un nivel apreciable de gliadinas en las líneas de trigo BW208 que expresan el péptido de la invención, atendiendo a este tipo de detección con el anticuerpo R5. En la Fig. 7B se observa una considerable reducción de gliadinas en esta otra variedad BW2003 transgénica de trigo.

En la Fig. 8 se observa en un gel SDS-PAGE la atenuación de las gliadinas de tres granos de la línea transgénica B375-3-1, denotados como A1, A2, A3 y las gliadinas de dos granos de trigo de la línea transgénica B377-2-3, ambas del genotipo BW208 cuando se hibridan con los anticuerpos específicos de gluten R5. Las líneas transgénicas contienen el promotor de γ -gliadinas, es decir, se transformaron con el vector pGhp- $\omega/\alpha/\beta/\gamma$.

ES 2 343 618 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido con al menos un 90% de identidad con respecto a una secuencia que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde:
- a. las secuencias a1, a2, b1 y b2 son diferentes entre sí y se seleccionan de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, de la siguiente forma:
- 10 b. si a1 es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4, b1 es SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 1 y a2 es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y
- c. si a1 es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, b1 es SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 2 y a2 es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.
- 15 2. Polinucleótido que comprende dos pares de secuencias (a1-a2) y (b2-b1) separadas por una secuencia espaciadora donde las secuencias a1, a2, b1 y b2 se describen en los apartados (a) a (c) de la reivindicación 1.
- 20 3. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde a1 es SEQ ID NO: 1, a2 es SEQ ID NO: 2, b2 es SEQ ID NO: 3 y b1 es SEQ ID NO: 4.
4. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la secuencia espaciadora es SEQ ID NO: 5.
- 25 5. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que además comprende una secuencia reguladora de la expresión génica unida funcionalmente a su extremo 5'.
6. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la secuencia reguladora de la expresión génica es SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 7.
- 30 7. Secuencia de RNA codificada por el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 capaz de formar un hpRNA donde la secuencia codificada por el par a1-a2 híbrida completamente con la secuencia codificada por el par b2-b1.
- 35 8. siRNA generado a partir de la secuencia del hpRNA según la reivindicación 7.
9. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Célula aislada transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 9.
- 40 11. Planta modificada genéticamente que comprende la célula transfectada según la reivindicación 10.
12. Planta según la reivindicación 11 que pertenece al género *Triticum*.
- 45 13. Planta según la reivindicación 12 que pertenece a la especie *Triticum aestivum* o *Triticum turgidum*.
14. Planta según la reivindicación 13 donde dicha planta es un cultivar Bobwhite o un cultivar Don Pedro.
15. Semilla que procede de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.
- 50 16. Polen, propágulo, progenie o parte de la planta que procede de cualquiera de las plantas según las reivindicaciones 11 a 14.
17. Uso del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.
- 55 18. Uso del vector según la reivindicación 9 para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.
19. Uso de la célula según la reivindicación 10 para el silenciamiento de alfa, beta, gamma y omega gliadinas de *Triticum* spp.
- 60 20. Uso de la semilla según la reivindicación 15 para preparar una composición alimenticia.
- 65 21. Uso de la composición de la reivindicación 20 para preparar un alimento funcional, complemento vitamínico o complemento nutricional.

ES 2 343 618 B1

22. Método para la obtención de la planta modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende:

- a. Seleccionar una parte de la planta,
- b. transfectar las células de la parte de la planta del apartado (a) con el vector según la reivindicación 9,
- c. seleccionar la célula transfectada del apartado (b) que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- d. regenerar al menos una planta procedente de la célula seleccionada en el apartado (c),
- e. seleccionar una o varias plantas regeneradas según el apartado (d) donde el polinucleótido se transcribe a un hpRNA,
- f. seleccionar una o varias plantas obtenidas según el apartado (e) que presentan silenciamiento de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas en sus semillas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

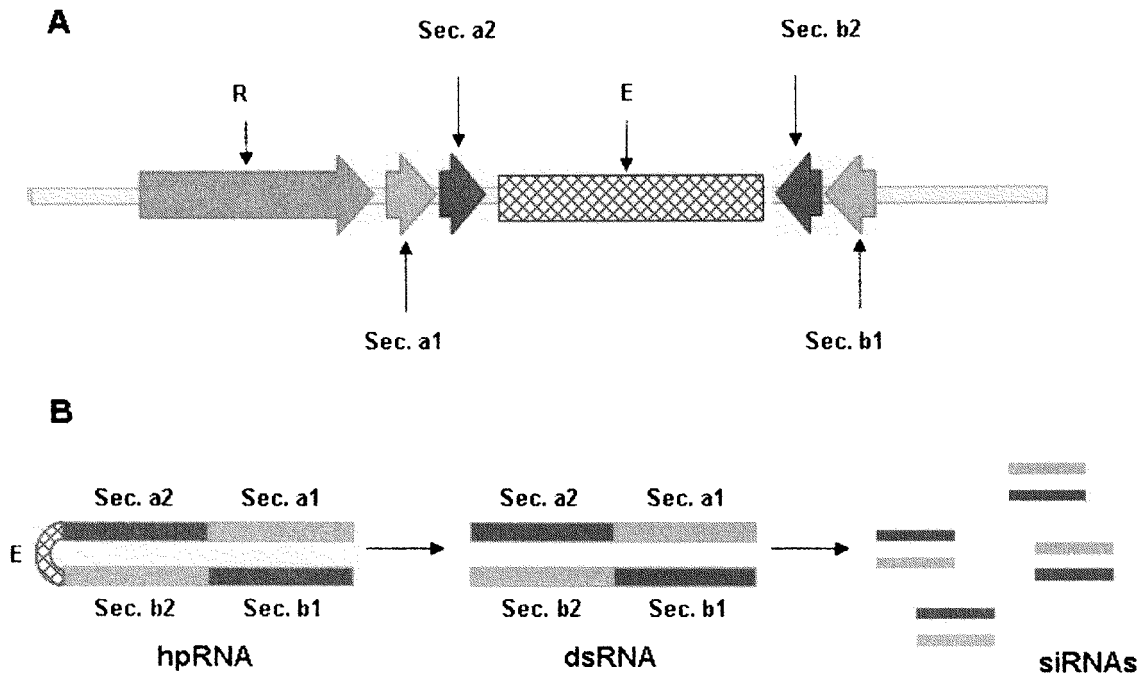


FIG. 1

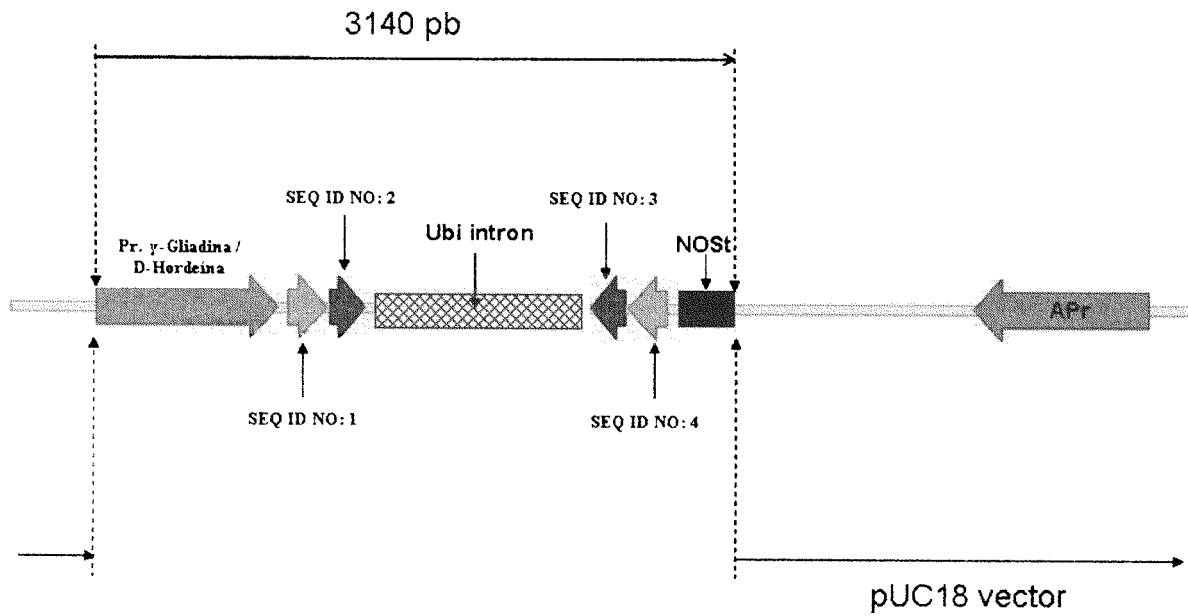


FIG. 2

A

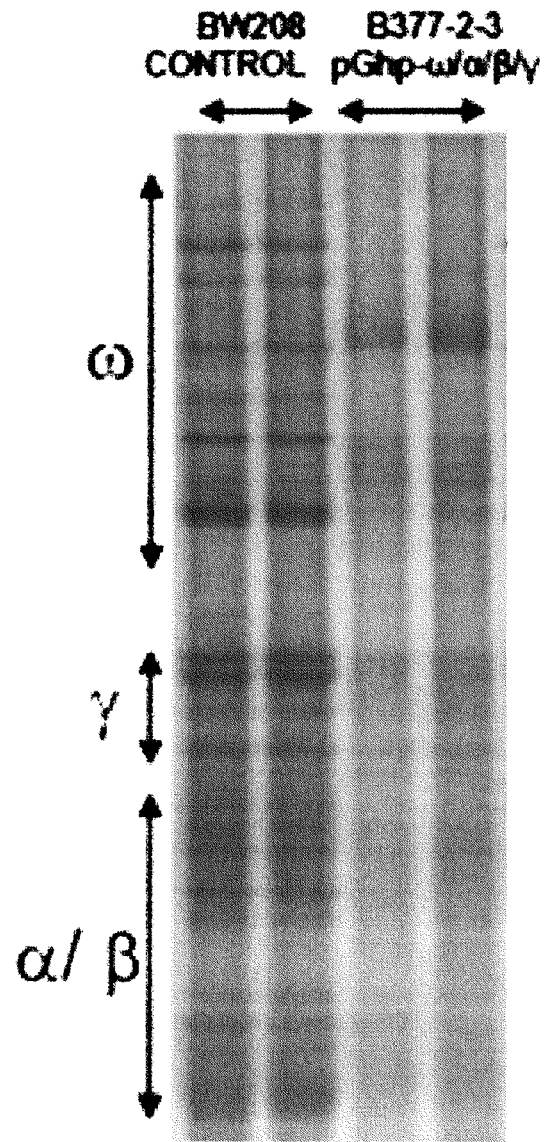


FIG. 3

B

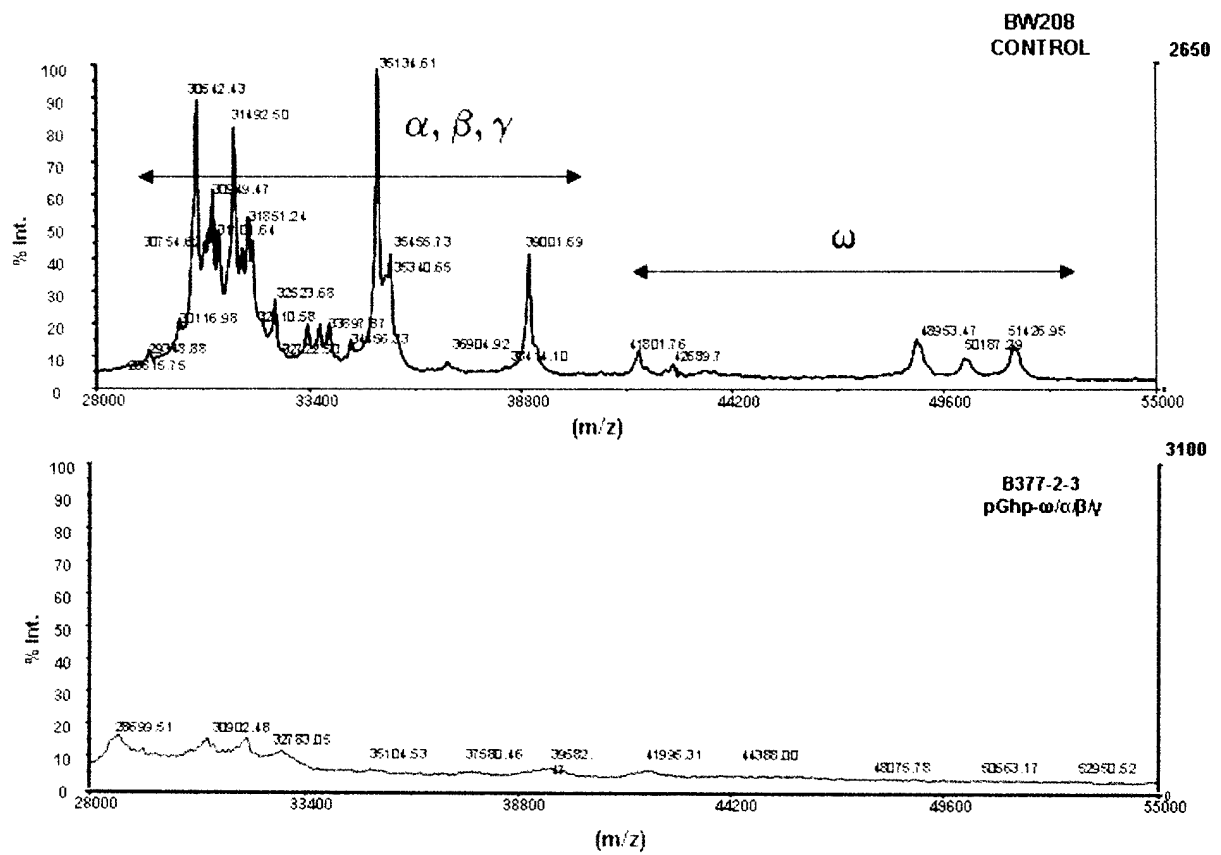


FIG. 3 (Cont.)

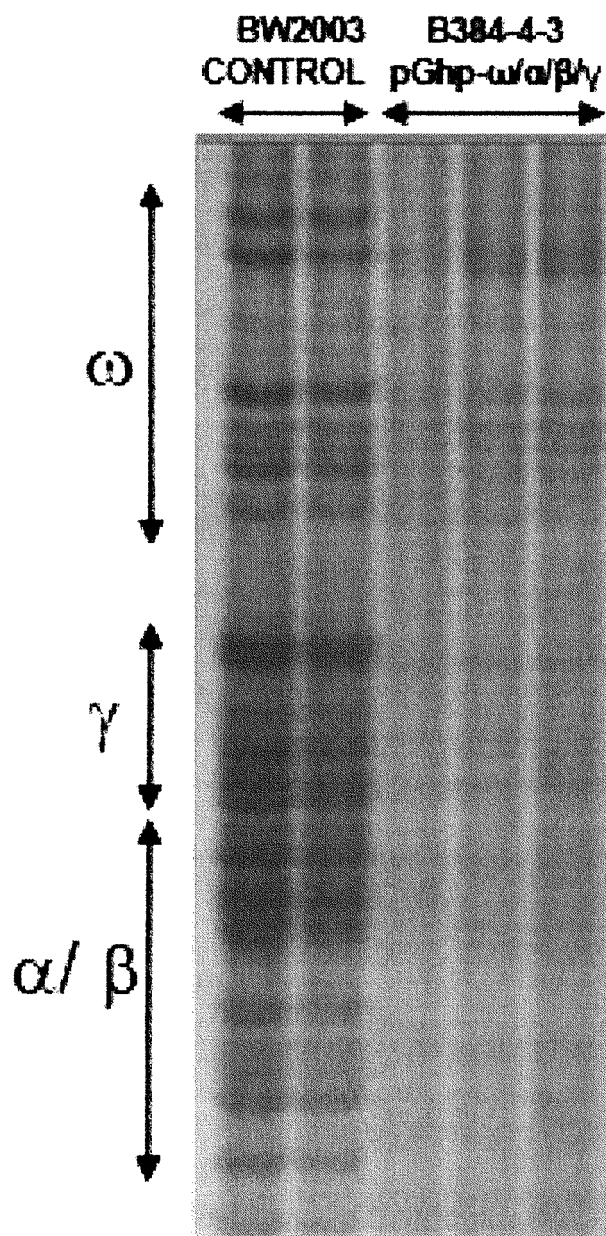


FIG. 4

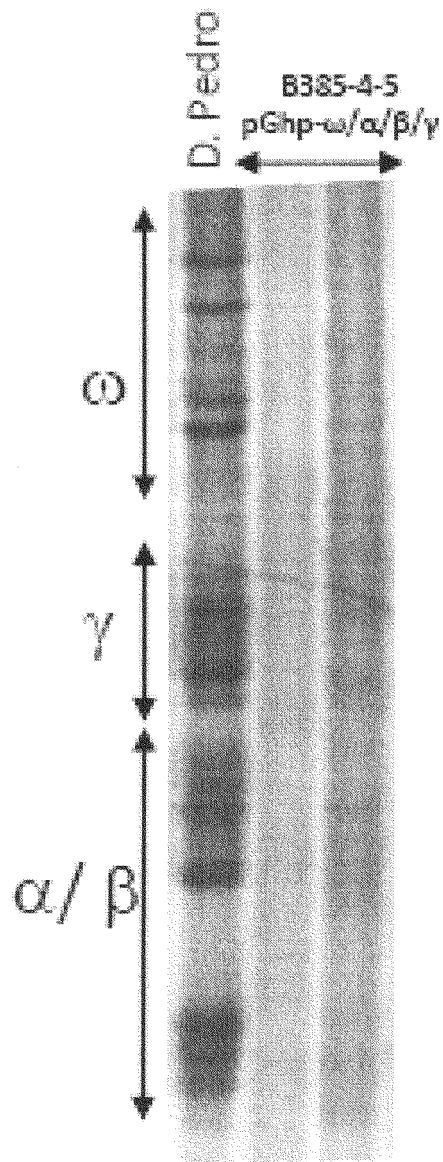


FIG. 5

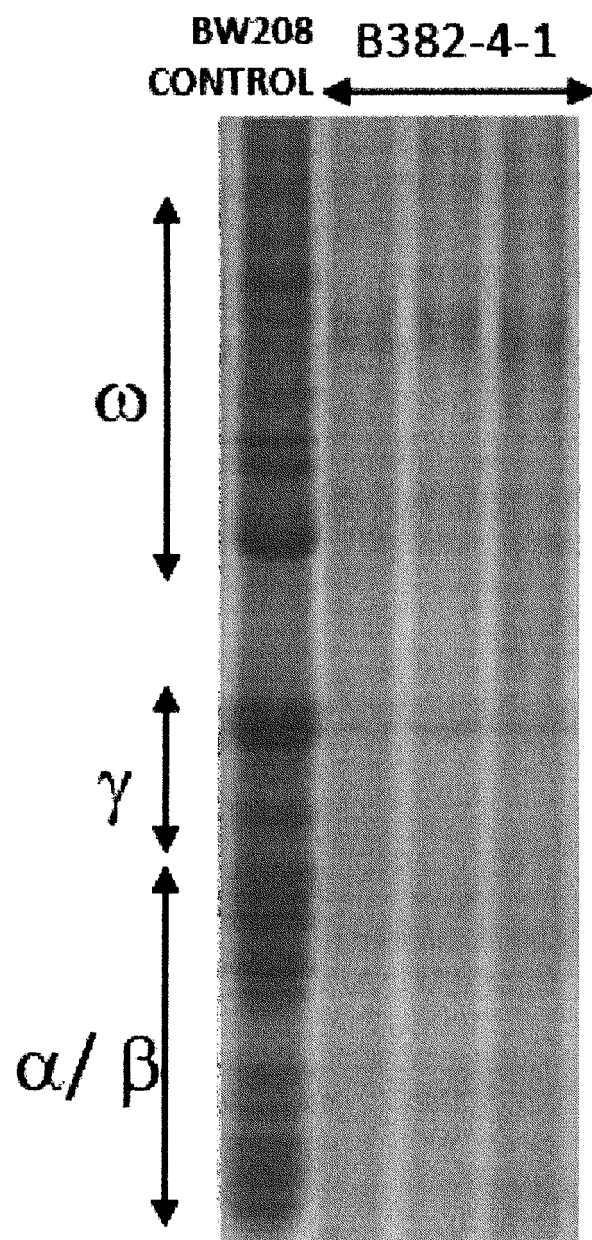


FIG. 6

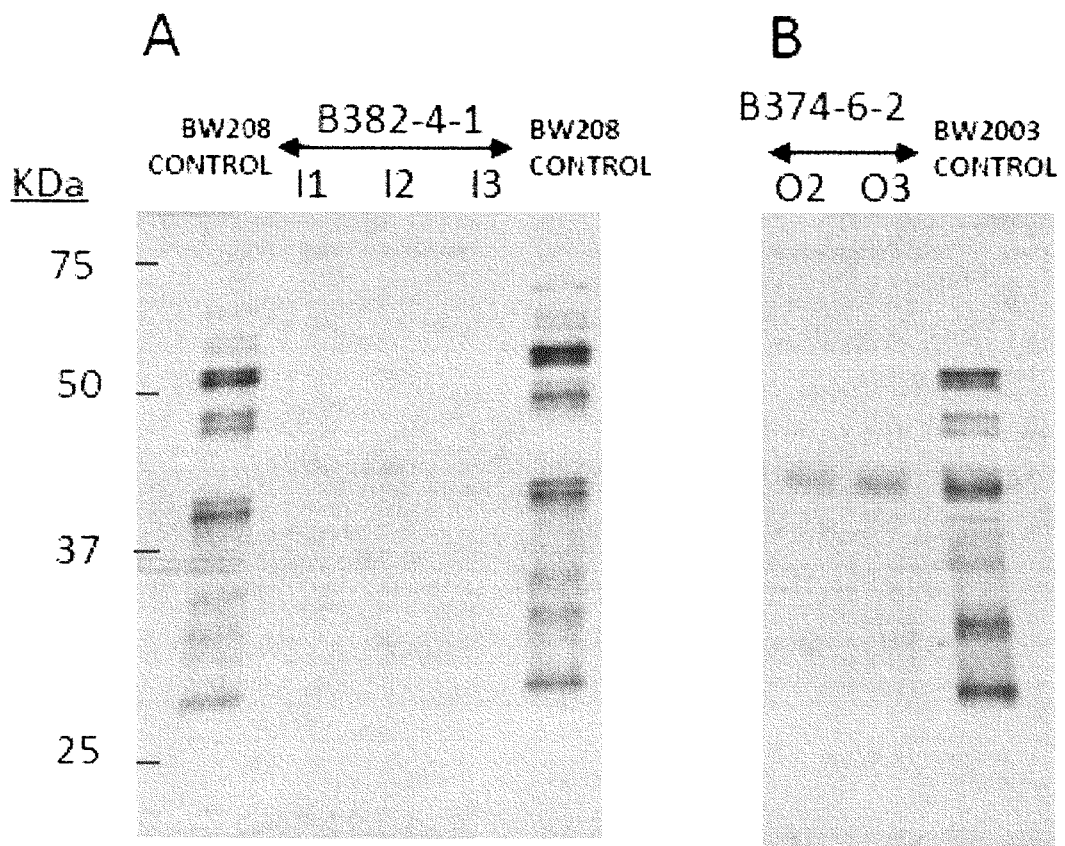


FIG. 7

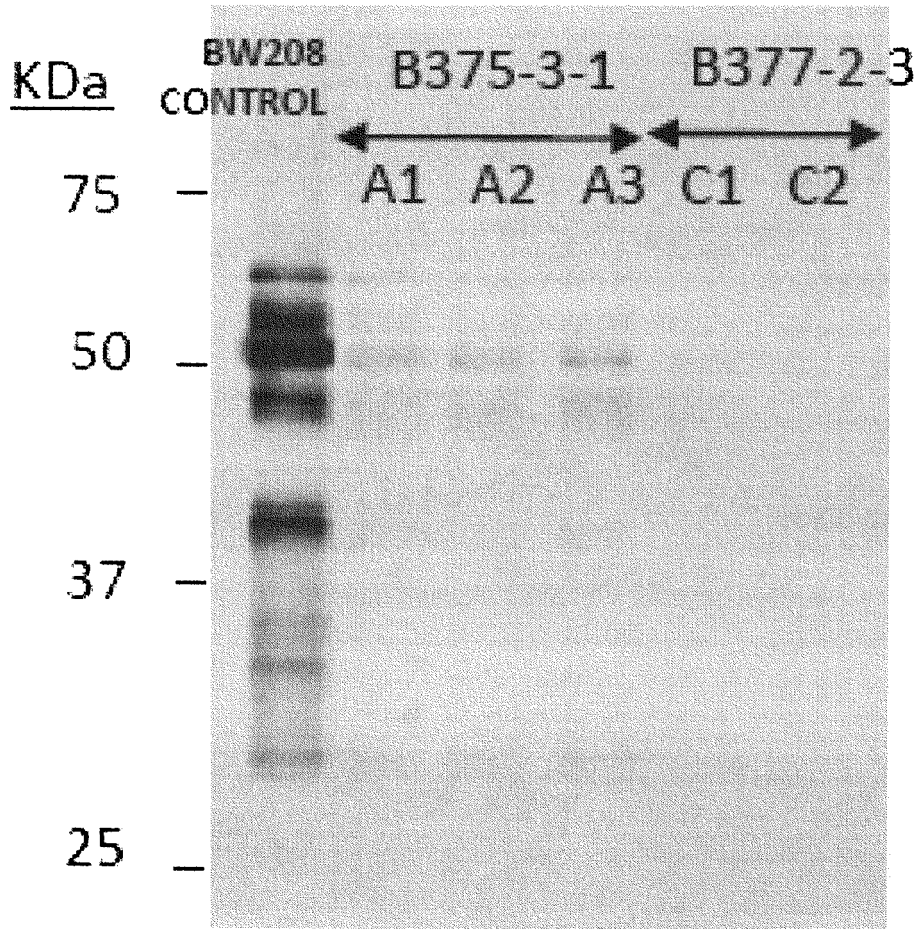


FIG. 8

ES 2 343 618 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSIC

5 <120> Polinucleótido que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para silenciamiento mediante RNAi

<130> ES1641.271

10 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 191

<212> DNA

20 <213> Artificial sequence

<220>

<223> secuencia sentido omega-gliadinas

25 <400> 1

ccctcctcat cttgtcctc ctgcatgg cgatgaagat cgccactgcc gctagggagt
60

30 taaaccctag caacaagag ttacaatcac ctcaacaatc atttcccat caacaacaac
120

catttcaca gcagccatat ccacaacaac catatccatc acagcaacca tatccatcgc
180

35 aacaaccatt t
191

40 <210> 2

<211> 170

<212> DNA

45 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia sentido de alfa, beta, gamma-gliadinas

50

<400> 2

caacaacaac tgattccatg cagggatggt gtattgcaac aacacagcat agcgtatgga
60

55 agctcacaag ttttgcaaca aagtacttac cagctggtgc aacaattgtg ttgtcagcag
120

60 ctgtggcaga tccccgagca gtcgcggtgc caggccatcc acaatgttat
170

<210> 3

65 <211> 170

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 343 618 B1

<220>

<223> Secuencia antisentido de alfa, beta y gamma-gliadinas

5 <400> 3

ataacattgt ggatggcctg gcaccgcgac tgctcgggga tctgccacag ctgctgacaa
60

10 cacaattggt gcaccagctg gtaagtactt tgttgcaaaa cttgtgagct tccatagcgt
120

15 atgctgtggt gttgcaatac aacatccctg catggaatca gttgttggtg
170

<210> 4

20 <211> 191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Secuencia antisentido de omega-gliadinas

<400> 4

30 aaatggttgt tgcgatggat atggttgctg tgatggatat ggttgttgtg gatatggctg
60

35 ctgtggaat ggttgttggt gatgggaaaa tgattgttga ggtgattgta actctttggt
120

gctagggttt aactccctag cggcagtggc gatcttcac gccatggcaa ggaggacaaa
180

40 gatgaggaag g
191

<210> 5

45 <211> 1011

<212> DNA

<213> *Zea mays*

50

55

60

65

ES 2 343 618 B1

<400> 5

5 gttcaaggta cgccgctcgt cctccccccc cccccctctc taccttctct agatcggcgt
60
tccgggtccat ggtagggcc cggtagttct acttctgttc atgtttgtgt tagatccgtg
120
10 tttgtgtag atccgtgctg ctacggttcg tacacggatg cgacctgtac gtcagacacg
180
ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc ctgggatggc tctagccgtt
240
15 ccgcagacgg gatcgaattc atgatttttt ttgtttcgtt gcataggggtt tggtttgccc
300
ttttccttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg ggtcatcttt tcatgctttt
360
20 ttttgtcttg gttgtgatga tgtggtctgg ttgggcggtc gttctagatc ggagtagaat
420
tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc tgtatgtgtg tgccatacat
480
25 attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg
540
ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt tgttcgcttg gttgtgatga
600
tgtggtgtgg ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg agtagaatac tgtttcaaac
660
35 tacctgggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg tcatacatct tcatagttac
720
gagtttaaga tggatggaaa tatcgaacta ggataggat acatgttgat gtgggtttta
780
40 ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat atgctctaac cttgagtacc
840
tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg atcttgatat acttggatga
900
45 tggcatatgc agcagctata tgtggatfff tttagccctg ccttcatacg ctatttattt
960
50 gcttgggtact gtttcttttg tcgatgctca ccctgttgtt tgggtgttact t
1011

<210> 6

<211> 885

<212> DNA

<213> *Triticum* spp

60

65

ES 2 343 618 B1

<400> 6

5 ttccagaaaa aactttgcta atgtatgaca gttatgtagt gaatattttc aacctaagga
 60
 acatttttaa tttatttttt ataaaattat aattcgactt ggcattcgaa tttggatttg
 120
10 agttttggtt tgaaacggaa agaggattag taaaatgatt atgatgacat agcatcatta
 180
 ggcatgagat tactgtagca tgacatgggg gtgttacct tgtacaatat tcctaccctt
 240
15 gacataaaaag gagaatttga tgagtcatgt attgataacg tataacaacat tactaccctt
 300
 gacataaaaag gagaatttga tgagtcatgc attgataaca tgtacaagat tactatcagc
 360
20 ttgttcactt taccatcata ttatacaaca ctacaagtta gttttagaaa gaacaagagt
 420
 ccacaacaaa tatcagaata cttgcctgat ctatcttaac aacatgcaca aggacacaaa
 480
 tttagtcccc cgcaagctat gaagatttgg tttatgtcta acaacttgta cagatccaaa
 540
30 aggaatgcaa tccagataat tgtttgacat gtaaagtgaa taagatgagt caatgccaat
 600
 tatcaagtat tcctcactct tagatgatat gtacaataaa aagacaactt tgatgatcac
 660
35 tctgaaatta cgtttgatg tagtgccacc aaacacaaca taccaaataa ttagtttgat
 720
 aagcatcaaa tcacttttaa aaaagaaagc aataatgaaa agaaacctaa ccatggtagc
 780
40 yataaaaagg cctacaatat gtagactcca taccatcatc catcgttcac acaactagag
 840
 cacaagcaga aaatcaaagt acgtagtagt taacgcaaat ccacc
 885

<210> 7

50 <211> 836

<212> DNA

<213> *Hordeum chilense*

55

60

65

ES 2 343 618 B1

<400> 7

5 ccattaattg aactcattcg ggaagcggga aaatttccaa ttctggtata aatcaaacta
60
tttgacgcga attttctctg aagatcatat gttaatttta gacatcactg accaaagggt
120
10 tcagttgggt gagttttgtc acggatacaa gatgcttcca tacgtcaaaa aattctacca
180
acttttggta cggcgcctcg tagcacggat agatcttctg tgctactgga tagatggtg
240
15 gtgtcactag attgatattg tgagtcatag catggatttg tgttcctgga aaaggggaatt
300
acatgacaag caacaaaacc tgaatgagc ttttgaaag atgatttatc agtttacttg
360
20 ttccatgcaa gctaccttc actactcgac atgcttagaa gcttcgagtg cccgcggatt
420
tgccaaagca atggctaaca gacacatatt ctgccaaaaa cccagaacga taatcgcttc
480
25 tcgtagatga agagaacaga ccaagataca aacgtccaca cttctgcaaa cagtacccca
540
gaactaggat taagccgatt acgtggcttt agcagaccgt ccaaaaaaac tgctttgcaa
600
30 agctccaatt cctccttgct tatccaattt cttttgtggt ggcaaaactgc actttttcca
660
35 accgattctg ttcttcccgt gtttcttctt aggctagcta acatagccgt gcacacagcc
720
atggtccgga accttcacct cgtccctata aaagcccagc caatctccac aatctcttca
780
40 tcaccgagaa caccgrgcac cacgaaacta gagatcaatt cattgacagt cggatg
836

45 <210> 8

<211> 21

<212> DNA

50 <213> *Triticum* spp

<400> 8

55 caacaacaac tgattccatg c
21

<210> 9

<211> 20

60 <212> DNA

<213> *Triticum* spp

<400> 9

65 ayracattrt ggatggcytg
20

ES 2 343 618 B1

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
5 <213> *Triticum* spp

<400> 10
 cccttcctcat ctttgcctc c
10 **21**

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
15 <213> *Triticum* spp

<400> 11
20 **aaatggttgt tgcgatggat a**
 21

<210> 12
<211> 30
25 <212> DNA
<213> *Triticum* spp

<400> 12
30 **cagttggttgt tgaaatggtt gttgcgatgg**
 30

<210> 13
35 <211> 30
<212> DNA
<213> *Triticum* spp

<400> 13
40 **caacaacat ttcaacaaca actgattcca**
 30

<210> 14
45 <211> 23
<212> DNA
<213> *Triticum* spp

<400> 14
50 **ttccagaaaa aactttgcta atg**
 23

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
60 <213> *Hordeum chilense*

<400> 15
 ccattaattg aactcattcg
65 **20**

<210> 16
<211> 19

ES 2 343 618 B1

<212> DNA

<213> *Streptomyces hygrosopicus*

5 <400> 16

gtctgcacca tcgtcaacc
19

<210> 17

10 <211> 20

<212> DNA

<213> *Streptomyces hygrosopicus*

15 <400> 17

gaagtccagc tgccagaaac
20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 618

② Nº de solicitud: 200900302

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.02.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20050260754 A1 (KOCK M y BAUER J) 24.11.2005, página 1, párrafos 1,9-14; página 2, párrafos 17,21; página 4, párrafos 51-55; página 6, párrafo 92; página 8, párrafo 112; página 9, párrafo 128; página 10, párrafos 139,145; página 11, párrafos 153,162; figura 2; reivindicaciones 1,2,5,6,8,11-15,19-21.	1-19
A	GIL-HUMANES J et al. 'Silencing of [gamma]-gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat'. Journal of Cereal Science. 2008. Vol. 48, páginas 565-568, todo el documento.	4-19
A	FOLCK A et al. 'Silencing the [alpha]-Gliadins in wheat'. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. (Abstracts Oral Presentation XII International Conference on Plant Embryology. Septiembre 5-7, 2005. Cracow, Poland). 2005. Vol 47(1), página 40.	4-19
A	VAN HERPEN TWJM et al. 'Silencing epitope-specific alpha gliadin genes using siRNA on specific SNPs'. In: Coeliac Disease Safe Gluten - The challenge to reduce toxicity while preserving wheat technological properties. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2008, ISBN: 978-90-8504-882-4, páginas 1-181, especialmente páginas 111-130.	7,17-20

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
30.04.2010

Examinador
Mª D. García Grávalos

Página
1/5

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

C12N, A01H

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

INVENES, EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PATENTSCOPE, SCIENCE DIRECT, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SÍ
	Reivindicaciones	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 ha sido publicada.

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
D01	US 20050260754 A1	24-11-2205
D02	GIL-HUMANES J et al. Journal of Cereal Science. 2008. Vol. 48, páginas 565-568.	2008
D03	FOLCK A et al. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. (Abstracts Oral Presentation XII International Conference on Plant Embryology. Septiembre 5-7, 2005. Cracow, Poland). 2005. Vol 47(1), página 40.	2005
D04	VAN HERPEN TWJM et al. Wageningen University, The Netherlands, 2008, ISBN: 978-90-8504-882-4, páginas 1-181.	2008

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

La presente invención divulga un polinucleótido de ADN que comprende secuencias de gliadinas de trigo y su uso para la obtención de ARN de interferencia (reivindicaciones 1-8). Se refiere también a vectores, células, partes de plantas o plantas modificadas genéticamente con el polinucleótido de la invención (reivindicaciones 9-16), y a un método para obtener las citadas plantas genéticamente modificadas (reivindicación 22). Asimismo, divulga el uso de los polinucleótidos, vectores y células para silenciar, de forma simultánea, la expresión de las alfa, beta, gamma y omega gliadinas del trigo, así como el empleo de las semillas obtenidas de las plantas transgénicas de la invención para elaborar preparados alimenticios.

El documento D01 se refiere a polinucleótidos de ADN que permiten obtener ARNs de interferencia capaces de regular, de forma simultánea, la expresión de al menos dos genes endógenos, y en particular de aquellos que codifican proteínas de almacenamiento en plantas, como son las prolaminas del trigo (ver página 1, párrafos 1, 9-14; página 2, párrafos 17, 21; página 4, párrafos 51-55; página 6, párrafo 92; página 8, párrafo 112; página 9, párrafo 128; página 10, párrafos 139, 145; página 11, párrafos 153, 162; figura 2; reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 8, 11-15, 19-21).

Los documentos D02 y D03 divulgan sistemas de silenciamiento de gamma y alfa gliadinas respectivamente a través de ARNs de interferencia (ver D02 y D03, todo el documento).

El documento D04 aborda el silenciamiento específico mediante ARN interferente de polimorfismos (SNPs) de alfa gliadinas que contienen epítomos reconocibles por células T y que provocan respuesta inmune en individuos con celiaquía (ver páginas 111-130)

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-22**

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica ya que anticipa polinucleótidos de ADN y ARNs interferentes análogos a los de la invención que permiten la regulación simultánea de la expresión de varios genes endógenos. Igualmente, incluye vectores, células y plantas transgénicas, y en particular de trigo, pero no comprende ninguna de las construcciones reivindicadas en la presente solicitud para el silenciamiento específico de alfa, beta, gamma y omega gliadinas.

Por su parte, el documento D02 anticipa polinucleótidos para el silenciamiento de gamma gliadinas. En particular, incluye un polinucleótido que comparte algunos de los elementos de los polinucleótidos reivindicados por los inventores, tales como el promotor de la D-hordeína y una secuencia no codificante correspondiente a un fragmento de intrón del gen Ubi1, que permite la formación del ARN de doble hebra. Sin embargo, D02 no anticipa de forma idéntica ninguno de los elementos reivindicados en la solicitud.

En consecuencia, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-22, cumple con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

Hoja adicional

En lo que respecta a la actividad inventiva, los polinucleótidos y ARN interferentes de la invención están basados en técnicas anteriormente divulgadas y emplean construcciones análogas a las anticipadas en los documentos D01 y D02. Sin embargo, la diferencia entre la solicitud y los documentos anteriores reside en el abordaje por parte de los inventores del silenciamiento simultáneo de todas las formas de gliadina. Con ello, la presente invención aporta una mejora evidente respecto al estado de la técnica, pues permite disponer de un sistema para lograr la potencial supresión o reducción de la totalidad de las gliadinas del gluten del trigo.

En base a la mejora técnica indicada, se considera que la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-22 posee actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D01-D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.