

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 200**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/02** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06740997 .9**  
96 Fecha de presentación: **02.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1883701**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.02.2008**

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

30 Prioridad:  
**29.04.2005 ZA 200503454**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.05.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF CAPE TOWN  
OBSERVATORY  
8001 CAPE TOWN, ZA**

72 Inventor/es:  
**WILLIAMSON, Anna-Lise;  
RYBICKI, Edward Peter;  
MACLEAN, James Malcolm y  
BECKER-HITZEROTH, Inga Isabel**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 381 200 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Expresión de proteínas virales en las plantas

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se relaciona con la expresión de proteína en las plantas. En particular, la presente invención se relaciona con un método de expresión de proteína transgénica y localización intracelular para la producción de proteínas con alto rendimiento. Esta invención se relaciona también con la producción de proteína del virus del papiloma humano (VPH) en una planta. Esta invención se relaciona además con un mecanismo rápido para evaluar la expresión de proteínas en las plantas.

El uso de plantas transgénicas para la producción a gran escala de proteínas heterólogas está ganando gradualmente gran aceptación, y podría ser una plataforma para la producción rentable de proteínas para vacunas. La generación de plantas transgénicas para investigar las características de expresión de una gran variedad de proteínas y/o vectores de expresión no siempre es viable debido a lo demorado de este proceso. Por el contrario, los sistemas de expresión transitoria son capaces de evaluar rápidamente la expresión de proteínas de una variedad de diferentes proteínas en una variedad de especies de plantas.

Otro problema relacionado con el uso de plantas transgénicas para producción a gran escala de proteínas son en general los niveles decepcionantemente bajos de proteína heteróloga producida. Los plastos de la planta, especialmente los cloroplastos, han sido transformados exitosamente con vectores recombinantes que expresan proteína heteróloga para aumentar significativamente los niveles de proteína producidos por la proteína soluble total en la planta (véase, por ejemplo, WO2005/011367 y WO2004/005467A2). Los plastos son también capaces de importar una variedad de moléculas, incluyendo proteínas. Existen diferentes procesos a través de los cuales ocurre esto, uno de los cuales implica la interacción con la membrana del tilacoidal del plástido. El direccionamiento de proteínas heterólogas hacia el plástido es un mecanismo para incrementar significativamente la acumulación de proteína dentro de la célula vegetal.

La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* ha sido utilizada durante muchos años para generar plantas transformadas en forma estable. Este método implica la transferencia del complejo T (un complejo formado con el ADN-T agrobacteriano y los productos génicos de virulencia) de cepas de *Agrobacterium* a células vegetales (Zupan et al., 2000). Cualquier ADN situado entre las repeticiones directas de 25 pb (bordes izquierdo y derecho) que delimitan al ADN-T monocatenario es transferido al núcleo de la célula vegetal (Zupan et al., 2000), donde se integra en el cromosoma de la planta a través de recombinación ilegítima (Somers y Makarevitch, 2004). Muchas de las copias de ADN-T presentes en el núcleo no se integran, pero consiguen ser transcritas, provocando expresión transitoria. La expresión transitoria no se ve afectada por el efecto de la posición, y puede producir niveles dramáticamente más altos de proteína foránea que la transformación estable (Kapila et al., 1997).

Dos métodos de infiltración de *Agrobacterium* (agroinfiltración) se utilizan comúnmente: infiltración por inyección e infiltración al vacío. La inyección de *Agrobacterium* consiste en la inyección directa en los espacios aéreos abaxiales de una hoja, mientras que la hoja está todavía unida a la planta (Voinnet et al., 2003). Durante la infiltración al vacío se aplica un vacío a una suspensión agrobacteriana en el que las hojas están sumergidas (Kapila et al., 1997). Aunque normalmente se realiza en tan sólo unas pocas hojas, esta técnica se puede ampliar: Los investigadores de Medicago Inc. (Quebec, Canadá) son capaces de agroinfiltrar hasta 7500 hojas de alfalfa por semana, y Stefan Schillberg y sus colegas (Instituto de Biotecnología Molecular, RWTH Aachen, Alemania) han agroinfiltrado hasta 100 kg de hojas de tabaco (Twyman 2004).

La expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* alcanza su máximo a las 60 a 72 horas después de la infiltración, y luego disminuye drásticamente como resultado de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Voinnet et al., 2003). El PTGS o la interferencia de ARN es una respuesta adaptativa de defensa antiviral que limita la replicación y propagación del virus en las plantas. Este proceso implica el reconocimiento de un ARN objetivo y la iniciación de una vía de degradación de ARN específica de la secuencia el citoplasma (Voinnet, 2001). Ciertos virus vegetales codifican supresores de silenciamiento que tienen la capacidad para inhibir el PTGS. Algunas de estas proteínas supresoras del silenciamiento, tales como NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate (TSWV) (Takeda et al., 2002), y el virus de la atrofia del follaje del tomate p19 (Voinnet et al., 2003) han sido utilizadas para prolongar y aumentar la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* por medio de la infiltración conjunta de *Agrobacterium* que contiene un gen supresor del silenciamiento.

Existe la necesidad de optimizar la expresión de proteínas comercialmente viables en las plantas hasta niveles que harían de las plantas una plataforma viable. En particular, existe la necesidad de un método para producir proteína del HPV en una planta.

También existe la necesidad por vectores, plantas transgénicas o partes de las mismas y por la progenie de tales

plantas para satisfacer la necesidad descrita anteriormente.

#### Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir polipéptidos L1 del HPV en una planta que comprende las etapas de:

- 5 1. clonación de un gen para L1 del HPV o ácido nucleico que codifica un equivalente funcional en un vector adaptado para dirigir un polipéptido expresado en el citoplasma a los cloroplastos presentes en la planta;
2. infiltrar al menos una porción de la planta con el vector o el tejido transformador de la planta con el vector para expresar transitoriamente los polipéptidos L1 del HPV en el citoplasma y luego importar los polipéptidos L1 del HPV en los cloroplastos y/o para crear una planta transgénica en donde los polipéptidos L1 del HPV se expresan en el
- 10 citoplasma y luego se importan en los cloroplastos; y
3. recuperar los polipéptidos L1 del HPV expresados por la planta.

El término "planta" pretende abarcar todos los organismos vivos que carecen de órganos sensoriales especializados y el poder de movimientos voluntarios. Como tal, la definición incluye tanto monocotiledóneas y las dicotiledóneas y todos los organismos fotosintetizadores.

El término "polipéptidos del HPV" pretende abarcar a la proteína L1 del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del VPH; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, proteína específica de células B o de células T y una proteína L2 del VPH o sus equivalentes funcionales. Lo mismo aplica, cambiando lo que haya que cambiar, al término 'gen del VPH'.

20 El término "componentes de la planta" pretende abarcar plastos, retículos endoplasmáticos, el citoplasma y apoplastos. Preferiblemente, el componente de la planta es un plástido.

Por direccionamiento se pretende que se puedan incluir en el vector secuencias objetivo. Tales secuencias objetivo pueden ser traducidas en un péptido que dirige al vector o al producto del mismo al componente deseado en la planta, tal como un plástido.

25 El vector de acuerdo con la presente invención incluye preferiblemente promotores y otros reguladores necesarios, tales como terminadores o similares operativamente enlazados a la secuencia de codificación.

Se apreciará que infiltrar por lo menos una porción de la planta con el vector puede dar lugar a la expresión transitoria de la proteína y la transformación del tejido de la planta con el vector para crear una planta transgénica puede dar lugar a la expresión transgénica de la proteína, ambas de cuyas formas de expresión se contempla que caigan dentro del ámbito de la presente solicitud.

En esta memoria la referencia a una proteína, un péptido o a un gen o sus equivalentes funcionales incluye referencias variantes de las mismas que son capaces de llevar a cabo en gran parte la misma función que la proteína, el péptido, el polipéptido o el gen. Preferiblemente, esta invención se relaciona con la producción de la proteína L1 del HPV-16; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del VPH; o un péptido quimérico L1 del VPH L1 fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de células B o de células T.

Preferiblemente, los vectores son vectores binarios, más preferibles vectores primarios de *Agrobacterium tumefaciens*.

40 El vector puede ser adaptado a plastos objetivo provocando que un polipéptido expresado incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los plastos, en particular, el mecanismo de transferencia de las membranas tilacoidales. Esta interacción puede hacer que el polipéptido sea importado dentro del plástido del citoplasma donde se expresa. El mecanismo de importación dentro del citoplasma puede ser importante para el plegamiento correcto de las proteínas.

45 Sin embargo, se apreciará que se puede adaptar el vector para lograr que los propios plastos se transformen y ocurra la expresión del polipéptido totalmente dentro del plástido.

Sin querer estar vinculados a ninguna teoría en particular, el solicitante es de la opinión de que un polipéptido importado dentro del plástido es importado en su estructura primaria y experimenta plegamiento a su estructura secundaria y terciaria dentro del plástido, es decir, distante del citoplasma de la célula.

Preferiblemente, el gen para L1 del VPH; el gen quimérico para L1 del VPH fusionado a otro gen antigénico del VPH;

o un gen quimérico para L1 del VPH fusionado a un gen heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de células B o de células T es un gen optimizado, por ejemplo, optimizado por codón humano, optimizado por el codón de BCG u optimizado por el codón de la planta. El gen para L1 del VPH o los genes de las quimeras para L1 del HPV L1 también pueden ser modificados de otra manera, por ejemplo señal de localización nuclear deficiente.

El método de acuerdo con la presente invención puede incluir además la etapa de infiltración conjunta de la planta con una proteína supresora adaptada para inhibir el silenciamiento post-transcripcional del gen en una planta. Preferiblemente, la proteína supresora es la proteína NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate o el virus de la atrofia del follaje del tomate p19. Más preferiblemente la proteína supresora es NSs.

10 Aquí se describen plastos seleccionados de entre cloroplastos, cromoplastos y leucoplastos. Los plastos escogidos en la presente invención son los cloroplastos.

La infiltración puede ser hecha por medio de inyección directa o por vacío. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las plantas enteras pueden ser infiltradas al vacío. En esta especificación, se debe considerar que 'plantas enteras' incluye a las plantas a las que se les habían quitado sus raíces, así como las plantas que han sido parcialmente defoliadas, así como las plantas en gran medida intactas. La referencia a una planta debe incluir una referencia a las partes de la planta, que incluyen, pero no se limitan a, semilla, hojas, raíces, tallos, flores, frutos, embriones, meristemos, hipocotiledones, epicótilos, cotiledones, polen y tejido.

En el método de acuerdo con la presente invención, tanto la infiltración y como la transformación de la planta se puede lograr con *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido transformado para aceptar al vector.

20 La planta también se puede seleccionar de entre *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*. Se apreciará, sin embargo, que cualquier planta que soporta la expresión transitoria de proteínas o que se ha vuelto transgénica será adecuada para los fines de la presente invención.

La infiltración se realiza preferentemente sobre las hojas de la planta. La infiltración por inyección directa se realiza preferiblemente en la región abaxial de la hoja.

25 De acuerdo con la presente invención, el método puede involucrar la producción del polipéptido L1 del HPV en una planta en donde sustancialmente toda la planta se infiltra con un vector adecuado por medio de infiltración al vacío.

También se describe aquí un polipéptido L1 del VPH siempre y cuando sea producido de acuerdo con un método como el descrito aquí anteriormente.

30 De acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un vector dentro del cual se ha clonado un gen para L1 del HPV, en donde dicho vector se adapta a cloroplastos objetivo presentes en una planta, ya sea para expresar en forma transitoria un polipéptido L1 del HPV en el citoplasma y luego importar el polipéptido del HPV dentro de los cloroplastos y/o para crear una planta transgénica donde el polipéptido L1 del HPV se expresa en el citoplasma y luego es importado dentro de los cloroplastos.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector dentro del cual se ha clonado un gen para L1 del HPV, en donde dicho vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en una planta, ya sea para expresar en forma transitoria un polipéptido L1 del HPV en el citoplasma y luego importar el polipéptido L1 del HPV dentro de los cloroplastos y/o para crear una planta transgénica en donde el polipéptido L1 del HPV se expresa en el citoplasma y luego es importado dentro de los cloroplastos.

40 También se describe aquí una vacuna profiláctica o terapéutica que consiste en un polipéptido L1 del HPV capaz de inducir una respuesta inmunogénica en un huésped adecuado, siempre que sea producida por un método como se ha descrito aquí anteriormente.

45 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una planta transgénica, una parte o la progenie de la misma que contiene una célula transformada con un vector adaptado a los cloroplastos objetivo presentes en la planta y que codifica un gen para L1 del HPV o un ácido nucleico que codifica un equivalente funcional del mismo, de tal manera que un polipéptido L1 del HPV se expresa en el citoplasma y luego es importado dentro de los cloroplastos.

En estos aspectos posteriores a la invención, las opciones y preferencias del primer aspecto, se aplican cambiando lo que se deba cambiar.

Existía la necesidad de optimizar la expresión de proteínas comercialmente viables en las plantas, a niveles que

harían de las plantas una plataforma viable. Un ejemplo es la producción de la proteína principal de la cápside L1 del VPH importante como capsómeros y/o como partículas similares al virus (las VLP) para los propósitos de una vacuna humana o un reactivo.

5 Siguiendo las enseñanzas de esta invención, se puede comparar la expresión de una cantidad de proteínas antigénicas, así como el efecto del compartimento de las células vegetales objetivo de las proteínas por expresión transitoria mediante agroinfiltración. Este método consiste en la infiltración de recombinantes de *Agrobacterium tumefaciens* que transportan los vectores de expresión dentro de las plantas mediante inyección directa, o mediante la creación de un vacío sobre las hojas sumergidas o remojadas en el cultivo de *Agrobacterium*.

10 L1 del HPV optimizado por codón humano o de codón BCG se expresó en niveles significativamente más altos que las otras secuencias de L1 y la optimización de codón humano también dio como resultado en una alta expresión de la proteína H5 de influenza. El direccionamiento hacia el cloroplasto provocó una acumulación significativamente mayor que el direccionamiento hacia el retículo citoplasmático o el endoplasmático (RE). La microscopía electrónica de los extractos de plantas enteras del L1 del HPV reveló que L1 se ensambló en partículas como el virus (las VLP) en las plantas. La proteína producida también reaccionó con los anticuerpos monoclonales específicos de L1 del HPV (MAb) que reconocen epítomos de conformación específica.

15 L1 obtenido a través de la expresión transitoria en plantas indujo altos niveles de anticuerpos específicos de L1 en ratones, y se encontró que estos anticuerpos son neutralizados en un ensayo de neutralización *in vitro*. Los vectores de expresión que facilitaron una alta expresión transitoria de L1 en los cloroplastos de las plantas fueron utilizados para generar plantas transgénicas que también expresaron altos niveles de los otros polipéptidos como se describió aquí anteriormente.

20 La infiltración de *Agrobacterium* al vacío normalmente implica la infiltración de las hojas que han sido removidas del tallo. La presente invención describe la novedosa infiltración al vacío de plantas intactas, o de plantas intactas sin raíces. Las plantas intactas con sistemas de raíces pequeñas se pueden remover de la tierra, se infiltran y se plantan nuevamente sin pérdida de viabilidad. Los sistemas de raíces grandes se pueden remover, se infiltra la planta, y luego se plantan nuevamente en la espuma de la planta que se va a cultivar por lo menos durante tres días sin pérdida de viabilidad. Las plantas con sistemas radiculares complejos también se puede cultivar en forma hidropónica lo que permite la infiltración sin necesidad de retirar las raíces. Las plantas enteras son más fáciles de incubar que las hojas sueltas después del proceso de infiltración, y sobreviven durante más tiempo, aumentando así la expresión del gen foráneo. La ventaja de infiltrar plantas intactas es la posibilidad de aumentar la producción

25 proteína foránea por medio de expresión transitoria hasta niveles que sean comercialmente viables.

30 La presente invención también enseña el direccionamiento de proteína L1 del VPH hacia sub-compartimientos específicos de las células de las plantas (ER y cloroplastos) por medio de agroinfiltración o en plantas transgénicas. El direccionamiento hacia el cloroplasto incrementa significativamente la acumulación de L1 sobre la acumulación citoplasmática y destinada al ER. La acumulación en el cloroplasto puede proteger a la proteína L1 de la degradación por parte de las proteasas presentes en el citoplasma y/o permitir que se acumule hasta una mayor concentración sin afectar la función de la célula de la planta.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Expresión de proteína L1 del VPH a altos niveles

40 Constructos de expresión

Tres vectores de *Agrobacterium*: pTRAc, pTRAc-rbcs1-CTP y pTRAc-ERH (Figura 1) fueron obtenidos a partir de Rainer Fischer (Instituto Fraunhofer, Aachen, Alemania). El vector pTRAc consiste de un promotor 35S (P35SS) del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), con reforzador transcripcional duplicado, región no traducida 5' de chalcona sintasa (CHS) y señal de poliadenilación 35S del CaMV (pA35S), para la expresión de gen foráneo; 2 regiones de

45 unión al andamiaje (SAR) para el gen RB7 del tabaco; los bordes izquierdo y derecho para integración del ADN-T; orígenes de replicación para *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y el gen *bla* para selección de antibióticos. pTRAc-rbcs1-CTP es un derivado de pTRAc con una secuencia adicional de rbcs-CTP (señal que se dirige al cloroplasto desde la subunidad pequeña de Rubisco de *Solanum*), formando una fusión 3' con el gen foráneo. pTRAc-ERH se deriva también de pTRAc, e incluye las secuencias KDEL y his6, formando una fusión 5' con el gen foráneo. Los vectores pTRAc-rbcs1-CTP y pTRAc-ERH también incluyen al gen *nptII*, para resistencia a la kanamicina en las plantas.

Cuatro variantes del gen para L1 del HPV-16 fueron clonadas en los vectores anteriormente mencionados de

*Agrobacterium*: (1) un aislado sudafricano, SAL1 (GenBank, acceso No. AY177679), (2) L1 optimizado por codón humano (HL1, Figura 2), (3) L1 optimizado por codón de planta (SYNL1, Figura 3), y (4) señal de localización nuclear deficiente, truncamiento del aminoácido 22 de HL1, HL1AC22.

5 Para facilitar la clonación direccional, se añadieron sitios de restricción de la enzima a los terminales de los genes para L1 mediante amplificación por PCR. Se amplificó SAL1 con iniciadores sentido: 5'-GGACGCGTTAGGT ACATGTCTCTTTGGCTGCCT (SEQ ID NO 1), e iniciador antisentido: 5'-TCTAGACTCGAGTTACAGCTT ACGTTTTTTGCGTTT (SEQ ID NO. 2), se digirió con *Afl* III y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios de pTRAc, formando pTra-SAL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-SAL1. Se amplificó también SAL1 con el iniciador sentido y el iniciador antisentido anteriores: 5'-  
10 AGCGGCCGC CAGCTTACGTTTTTTGCG (SEQ ID NO. 3), se digirió con *Afl* III y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-SAL1.

15 Se amplificó SYNL1 con el iniciador sentido: 5'-GGACGCGTGAGATTCATGAGCCTTTGGCTC CCT (SEQ ID NO. 4), y el iniciador antisentido: 5'-ATCTAGACTCGAGTTAGAGCTTCCTCTTCTTCTCTT (SEQ ID NO. 5), se digirió con *Bsp* HI y *Xho* I y se clonó en los sitios *Afl* III y *Xho* I de pTRAc, formando pTRA-SYNL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-SYNL1. SYNL1 también fue amplificado con el iniciador sentido anterior y el iniciador antisentido: 5'-AGCGGCCGCAGCTTCCTCTTCTTCTCTT (SEQ ID NO 6), se digirió con *Bsp* HI y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-SYNL1.

20 Se amplificó HL1 con el iniciador sentido: 5'-GGACGCGTGAGGTTTCATGAGCCTGTGGCTGCC C (SEQ ID NO. 7), y el iniciador antisentido: 5'-ATCTAGACTCGAGTCACAGCTTGCCTTCTTCCG (SEQ ID NO. 8), se digirió con *Bsp* HI y *Xho* I y se clonó en los sitios *Afl* III y *Xho* I de pTRAc, formando pTRA-HL1; o se digirió con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-HL1. Se amplificó también HL1 con el iniciador sentido anterior y el iniciador antisentido: 5'-AGCGGCCGCCAGCTTGCCTTCTTCCGC (SEQ ID NO. 9), se digirió con *Bsp* HI y *Not* I y se clonó en los sitios *Nco* I y *Not* I de pTRAc-ERH, formando pTRAERH-HL1.

25 Se formó HL1ΔC22 mediante amplificación por PCR de HL1, con el iniciador sentido anterior, y el iniciador antisentido: 5'-TCTAGACTCGAGTCAGCCCAGGGTGAAGCTTAGG (SEQ ID NO. 10), para facilitar la terminación antes de la NLS (Zhou et al. 1991). Se digirió el producto de la PCR con *Mlu* I y *Xho* I y se clonó en los mismos sitios en pTRAc-rbcs1-cTP, formando pTRACTP-HL1ΔC22.

30 Se amplificó el gen *gfp* mutante de 30B-GFPC3 (GenBank, acceso No. U62637) a partir de pBSG1057 (Biosource Technologies Inc., Vacaville, EE.UU.) con el iniciador sentido: 5'-GGACGCGTTAGGTCCATGGCTAGCAAAGGAGA AG (SEQ ID NO. 11), y el iniciador antisentido: 5'- ATCTAGATTATTTGTA GAGCTCATCCATG (SEQ ID NO. 12), se digirió con *Nco* I y *Xba* I y se clonó en los mismos sitios de pTRAc, formando pTRA-GFP.

#### Transformación de *Agrobacterium*

35 Se tornó al *Agrobacterium* GV3101 :: pMP90RK (obtenido de Rainer Fischer, Instituto Fraunhofer, Aachen) electrocompetente como lo describe (Shen y Forde, 1989). Se mezclaron 50 - 200 ng de los vectores de HPV-16L1/*Agrobacterium* con 100 µl de células electrocompetentes en una cubeta con paso de electrones de 0,1 cm (BioRad). Las células fueron transformadas en un GenePulser (BioRad), fijado en 1,8 kV, 25 µF y 200 Ω.

40 Se incubaron las células sometidas a electroporación en 1 ml de LB durante 2 horas antes de la siembra en placa sobre LB que contenía 50 µg.ml<sup>-1</sup> de carbenicilina, 50 µg.ml<sup>-1</sup> rifampicina y 30 µg.ml<sup>-1</sup> de kanamicina. Se verificaron los clones positivos por medio del aislamiento del ADN del plásmido de las colonias recombinantes de *Agrobacterium*, y la nueva transformación del ADN del plásmido en células DHSα de *E. coli* y selección sobre 100µg/ml de ampicilina.

Tabla A. Resumen de los recombinantes de *Agrobacterium* utilizados

| Clon            | Vector                   | Inserto  | Compartimento celular escogido | Cepa de <i>Agrobacterium</i> |
|-----------------|--------------------------|--|--------------------------------|------------------------------|
| pTRA-SAL1       | pTRAc                    | SAL1 (L1 aislado del HPV-16 sudafricano)                   | citoplasma                     | GV3101                       |
| pTRA-SYNL1      | pTRAc                    | SYNL1 (L1 del HPV-16 optimizado por el codón de la planta) | citoplasma                     | GV3101                       |
| pTRA-HL1        | pTRAc                    | HL1 (L1 del HPV-16 optimizado por codón humano)            | citoplasma                     | GV3101                       |
| pTRA-HL1        | pTRAc                    | <i>Gfp</i>   | citoplasma                     | GV3101                       |
| pTRACTP-SAL1    | pTRAc- <i>rbcS1</i> -cTP | SAL1   | plástidos                      | GV3101                       |
| pTRACTP-SYNL1   | pTRAc- <i>rbcS1</i> -cTP | SYNL1  | plástidos                      | GV3101                       |
| pTRACTP-HL1     | pTRAc- <i>rbcS1</i> -cTP | HL1  | plástidos                      | GV3101                       |
| pTRACTP-HL1AC22 | pTRAc- <i>rbcS1</i> -cTP | HLIAC22 (truncamiento de la señal de localización nuclear) | plástidos                      | GV3101                       |
| pTRACTP-GFP     | pTRAc- <i>rbcS1</i> -cTP | <i>Gfp</i>   | plástidos                      | GV3101                       |
| pTRAERH-SAL1    | pTRAc-ERH                | SAL1   | ER                             | GV3101                       |
| pTRAERH-SYNL1   | pTRAc-ERH                | SYNL1  | ER                             | GV3101                       |
| pTRAERH-HL1     | pTRAc-ERH                | HL1  | ER                             | GV3101                       |
| pTRAERH-GFP     | pTRAc-ERH                | <i>Gfp</i>   | ER                             | GV3101                       |
| pBIN-NSs        | pBIN                     | <i>NSs</i>   | citoplasma                     | LBA4404                      |

Preparación de *Agrobacterium* para infiltración

5 Se obtuvo *Agrobacterium* LBA4404 (pBIN-NSs), que contiene los genes supresores del silenciamiento de NSs del TSWV, de Marcel Prins (Laboratorio de Virología, Wageningen, Países Bajos). Se complementaron los cultivos de *Agrobacterium* GV3101 que contienen plásmidos basados en los vectores pTRAc, pTRAc-*rbcS1*-cTP-y pTRAc-ERH con 50 µg.ml<sup>-1</sup> de carbenicilina y 50 µg.ml<sup>-1</sup> de rifampicina. Se complementaron los cultivos de *Agrobacterium* LBA4404 (pBIN-NSs) con 50 µg.ml<sup>-1</sup> de rifampicina y 30 µg.ml<sup>-1</sup> de kanamicina. Los cultivos de *Agrobacterium* se desarrollaron con agitación a 27°C hasta fase logarítmica (OD<sub>600</sub> ≈ 0,8) en caldo LB, que contenía los antibióticos apropiados. Se recogieron las células por centrifugación a 4000 g, se resuspendieron en medio de inducción (caldo LB a pH 5,6 que contenía ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico [MES] 10 mM, acetosiringona 20 mM, y MgSO<sub>4</sub> 2 mM) con los antibióticos apropiados, y se desarrolló como anteriormente. Se recogieron las células por centrifugación, como anteriormente, y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM, sacarosa al 2% y 150 µg.ml<sup>-1</sup> de acetosiringona, pH 5,6). Para la infiltración al vacío se reemplazó el MgCl<sub>2</sub> con 4 g de sales MS.I<sup>-1</sup>. Se diluyeron las suspensiones de *Agrobacterium* en medio de infiltración hasta una OD<sub>600</sub> de 1,0, y fueron mantenidas a 22°C durante 2 - 3 h.

Agroinfiltración

Inyección: Se diluyeron suspensiones de *Agrobacterium*-L1 y *Agrobacterium* (pBIN-NSs) y combinaron en un medio de infiltración, ambas hasta un OD<sub>600</sub> final de 0,25. Cuando se infiltró en forma conjunta *Agrobacterium* (pTRA-GFP)

5 con la suspensión anterior, se utilizó hasta un OD<sub>600</sub> final de 0,0125. Se infiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* de 2 - 4 semanas de edad mediante la inyección de la suspensión de *Agrobacterium* en los espacios de aire abaxiales de la parte inferior de la hoja. Se agroinfiltraron seis hojas con cada mezcla agrobacteriana (3 plantas, 2 hojas/planta). Las plantas se desarrollaron durante 3 - 6 días bajo condiciones de luz de 16 h, oscuridad de 8 h, 22°C.

10 Vacío: Se cultivaron durante la noche *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs) en medio de inducción. Se combinaron las células de cada cultivo se combinaron y se resuspendieron en 1 - 8 litros de medio de infiltración, hasta un OD<sub>600</sub> final de 0,25 por cultivo. Se sumergieron plantas enteras de *N. benthamiana* o de *N. tabacum* (con las raíces removidas) L. cv. Petite Havana SR1 en la suspensión de *Agrobacterium* y se las sometió a un vacío de -90 kPa durante 10 minutos, con agitación ocasional para liberar las burbujas de aire atrapadas. Se liberó rápidamente el vacío (~ 10 kPa.segundo<sup>-1</sup>). Se plantaron nuevamente plantas de *N. benthamiana* en el suelo. Se colocaron los tallos de las plantas de *N. tabacum* en espuma floral saturada con agua. Las plantas se desarrollaron durante 3 días bajo condiciones de luz durante 16 h, de oscuridad durante 8 h, 22 °C.

#### Extracción y detección de proteína

15 Se recolectaron discos de hoja (tapa de un tubo de Eppendorf) a partir de hojas agroinfiltradas y se los molió en 250 µl de PBS altamente salina (NaCl 0,5 M) / disco de hoja. Se centrifugó el extracto a 13.000 rpm durante 5 min en una centrífuga de mesa, se recolectó el sobrenadante, y se repitió la centrifugación. Se llevaron a cabo extracciones a gran escala sobre plantas de *N. Tabacum* infiltradas al vacío: se homogenizaron las plantas con un mezclador Waring en 2 ml de amortiguador de extracción (fosfato de sodio 0,25 M, metabisulfito de sodio 0,1 M, EDTA 10 mM, polivinilpolipirrolidona al 4% [PVPP], pH 7,4)/g de material vegetal.

20 Se filtró el extracto a través de 2 capas de estopilla, después de lo cual se centrifugó el filtrado a 10.000 g durante 20 min. Se ultracentrifugó el sobrenadante resultante a 30.000 rpm durante 3 h, y se resuspendió el precipitado resultante en PBS, y se lo liofilizó para reducir el volumen. Se determinó la concentración total de proteína soluble (TSP) con un ensayo de Bradford (Sigma).

25 Para el análisis de transferencias tipo Western, se incubaron los extractos de las plantas a 85°C durante 2 minutos en amortiguador de carga (Sambrook et al., 1989), se separó en un gel SDS-PAGE al 10%, y luego se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semiseca. Se detectó proteína L1 con anticuerpo monoclonal H16:J4 (1:3000), y luego con un conjugado de fosfatasa alcalina antirratón de cabra (1:10000, Sigma). Se realizó la detección con Comprimidios de NBT / BCIP (Roche).

30 Se cuantificó la proteína L1 a partir de los extractos de plantas por medio de ELISA de captura, modificada a partir del método de ELISA de bloqueo con polivinil alcohol (PVA) de Studentsov et al. (2002). Se recubrió una placa de microtitulación de 96 pozos con anticuerpos monoclonales H16.J4 (enlaza al epítipo lineal de L1 del HPV-16) o H16.V5 (enlaza un epítipo conformacional) durante 1 hora a 37°C, se lavó y bloqueó. Se añadió luego extracto de planta durante 1 hora a 37°C, seguido por una etapa de lavado y la adición de suero policlonal VLP anti-HPV-16 de conejo (1:1000) durante 1 hora a 37°C. Se detectó este suero con conjugado anti-conejo-HRP de cerdo (1:5000; DAKO, Dinamarca) y sustrato de diclorhidrato de 1,2-fenilendiamina (OPD; DAKO).

35 Se detectó GFP por ELISA de captura. Se diluyeron los extractos de plantas en solución láctea al 1% (leche en polvo Elite ® en PBS con Tween 20 al 0,05% [PBS-T]), y se incubaron sobre una placa recubierta de Reacti-Bind anti-GFP (Pierce) durante 1 hora a 37°C. Se lavó 4 veces la placa con PBS-T, seguido por la adición de conjugado anti-GFP HRP de cabra (1: 2000 en solución de leche al 1%; Abcam), se incubó la placa durante 30 minutos a 37° C, y después se lavó 4 veces con PBS-T. Se utilizó sustrato TMB (KPL) para la detección.

#### Microscopía electrónica

Se inmunoatrapó el extracto de la planta con anticuerpo H16.V5 (1:50) sobre rejillas de cobre recubiertas de carbón. Se tiñeron las rejillas con acetato de uranilo al 2% y se hizo la observación utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 200CX.

45 Inmunización de ratones con extracto de planta y análisis del suero

50 Aproximadamente 350 g de *N. tabacum* que habían sido infiltrados al vacío con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y con *Agrobacterium* (pBIN-NSs) fueron extraídos como se describió anteriormente y se resuspendieron en PBS al 0,5%. Se inmunizaron ratones BALB/c por vía subcutánea con 100 µl del extracto de la planta (11 µg de L1), ya sea con la adición de adyuvante incompleto de Freund (4 ratones) o sin (5 ratones). Se inmunizaron los grupos de control dos veces con 10 µg de las VLP producidos en baculovirus, o una vez con 1 µg de las VLP producidas en baculovirus. Se recolectó suero de la vena del ojo 4 semanas después de la inmunización.

Se utilizó un ELISA de bloqueo de PVA (Studentsov et al., 2002) para detectar anticuerpos para L1 en los ratones.



Se recubrió una placa de microtitulación con las VLP L1 del HPV-16 producidas por baculovirus ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ ), se las bloqueó durante 2 h  $4^\circ\text{C}$  con PVA al 0,5% en PBS, y luego se lavó 6 veces con PBS. Se diluyeron en forma serial los sueros en PVA al 0,5% (1:40 a 1:40960) y se incubaron sobre la placa a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Después de lavar 6 veces con PBS, se añadió el conjugado de HRO antirratón de conejo con HRP (1:2000; DAKO) durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se llevó a cabo la detección con sustrato OPD (DAKO).

El ensayo del anticuerpo que neutraliza al pseudovirus VPH-16 se realizó de acuerdo con el método de (Pastrana et al., 2004). Los plásmidos necesarios para el ensayo se obtuvieron de John Schiller (Laboratorio de Oncología Celular, Instituto Nacional del Cáncer, en Bethesda, EE.UU).

#### Transformación y regeneración de la planta

Se cortaron hojas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* en pedazos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$ , se las esterilizó en blanqueador al 10% de lejía y se lavó con agua estéril. Se sumergieron los discos de hoja en el cultivo de *Agrobacterium* relevante recombinante y crecieron sobre un medio de cultivo conjunto (Tabla 2) bajo luz constante durante dos días. Los discos de hojas fueron colocados entonces en medio de regeneración fresco (Tabla 2) cada dos semanas hasta que aparecieron brotes pequeños (4 - 6 semanas). Los brotes de 1,5 - 2 cm se transfirieron a medio de enraizamiento (Tabla 2). Los brotes fueron incubados hasta que fue evidente el crecimiento fuerte de la raíz, y luego trasplantados a una mezcla de suelo / vermiculita (2:1), recubiertos con bolsas de plástico y se mantiene alejado de la luz directa durante tres días antes de ser trasladado a la luz directa. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas por medio de la PCR utilizando el kit para PCR de la planta N-Amp del extracto (Sigma) e iniciadores específicos de L1.

Tabla B: Medios para la transformación y regeneración de tabaco. Todos los medios contenían MS con vitaminas (Highveld Biological, Sudáfrica), sacarosa al 1% y agar al 0,8%.

|                                   | Cultivo conjunto                   | Regeneración                       | Enraizamiento                      |
|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Ácido $\alpha$ -naftaleno acético | $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ | $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |                                    |
| Bencilaminopurina                 | $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   | $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   |                                    |
| Cefotaxima                        |                                    | $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ | $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |
| Kanamicina                        |                                    | $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ | $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ |

El método de inyección de infiltración demostró ser útil para la comparación rápida de numerosos constructos de *Agrobacterium*, y para la optimización de las concentraciones de cultivo para infiltración. El análisis de transferencias tipo Western de muestras de hojas de *N. benthamiana* (Figura 4), después de la infiltración con *Agrobacterium* portador del gen para L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (HL1), demostró la expresión exitosa del monómero de L1 de 55 kDa. La expresión de HL1 del vector pTRA-HL1 (localización citoplasmática de L1) no pudo ser detectada después de 6 días, a menos que se produjera infiltración conjunta de *Agrobacterium* (pBIN-NSS). Por otro lado, HL1 dirigido al cloroplasto (vector pTRACTP-HL1) produjo niveles detectables de HL1 sin *Agrobacterium* (pBIN-NSS), que fueron reforzados con la infiltración conjunta de *Agrobacterium* (pBIN-NSS).

Los resultados anteriores fueron confirmados por medio de ELISA de captura (Figura 5). Además, el ELISA estableció que L1 se ensambló en las estructuras multiméricas necesarias para la generación de anticuerpos de neutralización, ya que el mAb H16.V5 utilizado para este ELISA de captura es específico para un epítipo conformacional formado por pentámeros y las VLP. La formación de las VLP se confirmó por medio de microscopía electrónica (Figura 6) de un extracto crudo de una hoja de *N. benthamiana* que había sido infiltrada con *Agrobacterium* GV3101 (pTRACTP-HL1).

La optimización del codón y el direccionamiento hacia el compartimiento de la planta afectó significativamente la acumulación de L1 (Figura 7). Los niveles de acumulación de SYN1 y SAL1 en hojas agroinfiltradas fueron a menudo bajos o indetectables, sin embargo, HL1 se acumuló hasta niveles altos (hasta  $\sim 600 \text{ mg}$  de L1/kg de material de la hoja; -17% de TSP). Fue sorprendente que L1 optimizado por el codón de la planta (SYN1) se expresara en niveles inferiores que L1 nativo (SAL1). El direccionamiento de L1 a los cloroplastos aumentó su acumulación significativamente tanto sobre L1 citoplasmático como el dirigido al ER, y puede ser un resultado de la protección de las proteasas presentes en el citoplasma. La expresión de L1 fue más baja cuando se dirigió al ER. Se utilizó *Agrobacterium* (pTRA-GFP) para medir las desviaciones de eficiencia de la infiltración entre las hojas (que se encuentra por lo general que son pequeñas, con una diferencia del 14% entre las infiltraciones más y menos

eficientes).

Hemos demostrado el potencial para la expresión a mediana escala o posiblemente a gran escala de VPH-L1 en *N. benthamiana* y *N. tabacum* L. cv. Petite Habana SR1 por la infiltración al vacío. La infiltración al vacío de plantas de *N. benthamiana* enteras se produjo fácilmente en el 90 - 100% del área foliar, y en 70 - 90% de la superficie de la hoja de *N. tabacum*. Por medio de infiltración al vacío de plantas enteras, en lugar de hojas sueltas como lo describen Kapila et al. (1997), fue relativamente fácil aumentar la infiltración hasta 2 kg del material de la planta *N. tabacum*.

Una sola inmunización de ratones BALB/c con un extracto crudo de *N. Tabacum*/HL1 indujo títulos altos de anticuerpo específicos de VLP del HPV-16 (40 960) (Figura 8), que eran equivalentes a aquel provocado en ratones después de 2 inmunizaciones con 10 µg de las VLP producidas por baculovirus. La adición de adyuvante incompleto de Freund al extracto de la planta no parece aumentar la respuesta humoral producida para HL1, lo que sugiere que las proteínas acompañantes de la planta en la muestra sin adyuvante incompleto de Freund pueden tener propiedades adyuvantes. Se llevó a cabo un ensayo de neutralización *in vitro* del pseudovirus HPV-16 utilizando los sueros de ratón anteriores (Tabla 3). Este ensayo se basa en la capacidad de neutralización del suero para bloquear la entrada de pseudovirus HPV-16 de la SEAP en las células, deteniendo así la transferencia del gen reportero para la SEAP en las células. Los ratones que habían sido inmunizados con el extracto crudo de *N. Tabacum*/HL1, provocaron con éxito niveles neutralizantes de anticuerpo mayores a los provocados por 2 inmunizaciones con 10 µg de las VLP producidas por baculovirus. Fue sorprendente que los niveles de anticuerpo neutralizantes provocados por el extracto de *N. tabacum*/HL1 fueran menores cuando se le añadió adyuvante incompleto de Freund.

Las plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* fueron exitosamente transformadas con *Agrobacterium* que transportaba el gen para L1 del HPV-16 optimizado por codón humano. Como se observó con la expresión transitoria, se acumuló L1 dirigido al cloroplasto hasta niveles altos altos niveles en las plantas transgénicas (hasta 60 mg de L1/kg de material de la planta, el 10,6% de la TSP) (Figura 9). La observación de que L1 fue detectada con el mAAb del H16.V5 específico de la conformación de los extractos de hojas transgénicas sugiere que están presentes capsómeros y posiblemente una formación de VLP en estas plantas.

Tabla C. Ensayo de neutralización del pseudovirus HPV-16 de la SEAP que analiza la inducción de anticuerpos de neutralización en ratones, después de la inmunización con extracto crudo de planta/HL1. Tres días después de que se infiltraran al vacío plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs), se produjeron extractos de planta concentrados y utilizaron con ratones inmunizados. Se tomaron sueros 4 semanas después de la inmunización. Se definieron los títulos de neutralización como el recíproco de la dilución de suero más alta que causó al menos una reducción del 50% en la actividad de la SEAP. Los títulos por debajo de 25 se consideraron negativos.

| Antígeno  | Neutralización (recíproco de la dilución más alta del suero para provocar al menos una reducción del 50% en la actividad de la SEAP) |
|---|--|
| PBS   | < 25   |
| Planta/Agro pTRA-HL1                                  | 6400   |
| Planta/Agro pTRA-HL1 + adyuvante incompleto de Freund | 1600   |
| 1 µg de VLP de HPV-16 producido por baculovirus       | < 25   |
| 2 x 10 µg de VLP de HPV-16 producidos por baculovirus | 1600   |

## Ejemplo 2

Proteína HA subtipo H5 del virus de la influenza expresadas en niveles elevados

Construcción del plásmido

El gen de longitud completa del gen para HA (H5, 1704 pares de bases, Figura 10) del virus A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) de la influenza (GenBank, acceso no. AY651333) y un gen para HA truncado en 23 aminoácidos (H5tr, 1635 pb, Figura 11) fueron optimizados por codón humano, y sintetizados por Geneart (Alemania). H5tr fue truncado desde el nucleótido 1597-1665 para eliminar su dominio de anclaje a la membrana (Figura 12): esto debe impedir

que la proteína HA se asocie con las membranas celulares, y debe permitir que la proteína H5tr sea secretada por células de la planta después del procesamiento apropiado en el ER, que en gran medida puede ayudar a su purificación. Se añadieron secuencias de reconocimiento de la enzima durante la síntesis del gen para facilitar la clonación.

- 5 Los genes H5 y H5tr fueron cada clonados en los tres vectores de *A. tumefaciens*, en el Ejemplo 1. Los genes H5 y H5tr fueron digeridos con Nco I y Xba I y se clonaron en los sitios *Afl* III y *Xba* I de pTRAc, formando los clones pTRA-H5 y pTRA-H5tr. Para la clonación en pTRAc-ERH, se digirieron tanto el vector como los genes H5/H5tr con Nco I y Not I, formando pTRAERH-H5 y pTRAERH-H5tr. Se digirieron los genes H5 y H5tr con Mlu I y Xba I y se clonó en pTrakc-rbcs1-cTP, formando los clones pTRACTP-H5 y pTRACTP-H5tr. Se construyó un cuarto grupo de clones, pTRAa-H5 y pTRAa-H5tr, por medio de la clonación de los genes H5 y H5tr (digeridos con Nco I y Xba I) en el vector pTRAc-ERH después de digestión con Nco I y Xba I, eliminando así la señal de retención del ER (SEKDEL) para crear constructos objetivo apoplásticos.

#### Transformación de *Agrobacterium*

La transformación de *Agrobacterium* se realizó como en el ejemplo 1.

#### 15 Agroinfiltración

- 20 Se desarrollaron cultivos de *A. tumefaciens* GV3101 recombinante que contenían los clones del vector binario H5 y H5tr, y *A. tumefaciens* GV3101 (pTRA-P19), que contenía al gen supresor del silenciamiento de p19 del virus de la atrofia del follaje del tomate, con agitación a 27° C hasta fase logarítmica ( $OD_{600} = 0,8$ ) en caldo LB complementado con 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de carbenicilina, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de rifampicina y 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de kanamicina. Se recolectaron las células por centrifugación a 4000 g, se resuspendieron en medio de inducción (caldo LB a pH 5,6 que contenía MES 10 mM, acetosiringona 20  $\mu\text{M}$ , y  $\text{MgSO}_4$  2 mM) con los antibióticos apropiados, y se desarrollaron como anteriormente. Se recolectaron las células por centrifugación, como anteriormente, y se resuspendieron en medio de infiltración ( $\text{MgCl}_2$  10 mM, MES 10 mM, sacarosa al 2% y 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de acetosiringona, pH 5,6). Las suspensiones de *A. tumefaciens* se diluyeron en medio de infiltración hasta una  $OD_{600}$  de 1,0, y se mantuvieron a 22° C durante 2 - 3 horas.

- 25 Se combinaron suspensiones de *A. tumefaciens*-H5 o *A. tumefaciens*-H5tr con *A. tumefaciens* (pTRA-P19) y se diluyó con el medio de infiltración hasta una  $OD_{600}$  final de 0,25 por cada cultivo. Se infiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* mediante la inyección de la suspensión bacteriana en los espacios aéreos abaxiales de la parte inferior de la hoja. Cuatro hojas fueron agroinfiltradas con cada mezcla agrobacteriana. Las plantas se desarrollaron durante 6 días bajo condiciones de 16 horas de luz y 8 h de oscuridad, 22° C.

#### 30 Extracción de proteína y detección de HA

Se recolectaron discos de hojas de *N. benthamiana* (cortados utilizando la tapa de un tubo de microcentrífuga 2 ml) a partir de hojas agroinfiltradas, y se molieron en 250  $\mu\text{l}$  de amortiguador fosfato de alta salinidad (NaCl 0,5 M)/disco. Se centrifugó el extracto a 13 000 rpm durante 5 min, se recolectó el sobrenadante, y se repitió la centrifugación.

- 35 Las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de HA por medio de transferencias tipo Western. Los extractos de las plantas se incubaron a 85° C durante 2 min en amortiguador de carga {Sambrook, 1989 33369 /id}, se separó sobre un gel SDS-PAGE al 10%, y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia semiseca. Se detectó la proteína HA con suero de pollo positivo para H5 (1:000; James Kitching, Elsenburg, Departamento de Agricultura de Western Cape), suero antipollo de conejo (1:1000, Ed. Rybicki, UCT), y luego con conjugado de fosfatasa alcalina anti-conejo de cerdo (1:10 000, Sigma). La detección se realizó con comprimidos de NBT / BCIP (Roche).

- 40 La agroinfiltración demostró ser útil para comparar rápidamente la expresión de numerosos constructos de HA plantas. Los resultados preliminares muestran que la mayor acumulación de la proteína HA se obtuvo al utilizar los constructos pTRAERH-H5 y pTRAERH-H5tr, que dirigían la proteína al ER (Figura 13). HA no podía ser detectada cuando se utilizaron los otros constructos.

### Ejemplo 3

#### Construcción del plásmido

- 50 Los vectores de *Agrobacterium* pTRAc, pTRAc-ERH, pTRAc-A, y pTRAc-rbcs1-cTP (Fig. 14) fueron suministrados por Rainer Fischer (Instituto Fraunhofer de Biología Molecular y Ecología Aplicada IME, Aachen, Alemania). Se incluyeron sitios de restricción enzimática en cada extremo del ORF de L2 por medio de reacción en

cadena de polimerasa (PCR), para facilitar la clonación direccional en los tres vectores de *Agrobacterium*. El marco de lectura abierto (ORF) de 1,4 kb de L2 del VPH-16 de tipo silvestre (saL2), el codón del ORF de L2 del HPV-16 optimizado para la expresión en plantas (vegetalizado) y el ORF de L2 del HPV-16 optimizado por codón para expresión de mamíferos (humanizado) fueron amplificados por medio de PCR. La optimización del codón para *Nicotiana* de L2 del VPH-16 (pL2) fue hecho por GENEART® (Regensburg, Alemania). El L2 del HPV-16 humanizado (hL2) fue suministrado por Martin Müller (Alemania).

Los vectores pTRA mantienen una cantidad de características que optimizan la expresión del gen foráneo. pTRAc contiene las características del esqueleto y es competente en la expresión del transgén en el citoplasma de las células de la planta (Fig. 14). El vector pTRAc-ERH incluye todas las características de pTRAc con algunas adiciones (Fig. 14). Se añadió un gen de resistencia a la kanamicina (*nptII*), esto permite que estos vectores sean utilizados para la generación de plantas transgénicas. En este estudio, sin embargo, se utilizó expresión transitoria. pTRAc-ERH también incluye secuencias que resultan en las fusiones del terminal carboxilo de una etiqueta His y la señal de retención (KDEL) del retículo endoplasmático. Se cree que la secuencia de KDEL retarda las proteínas en el ER, donde pueden ser protegidas de la degradación. La secuencia de KDEL puede inferir la protección contra la degradación ya que las proteínas que son incapaces de formar su conformación final, permanecen en el ER (1). Las proteínas presentes en el ER que no tienen una secuencia de KDEL son degradadas (1). El vector pTRAc-A se deriva del vector pTRAc-ERH, contiene la señal secretora 'LPH' pero carece de la 'KDEL', con lo que la proteína es secretada fuera de la célula en el espacio apoplástico. El vector pTRAc-rbcs1-CTP que se basa en pTRAc, también incluye la secuencia del dominio objetivo del estroma (STD), rbcs1-CTP, que forma una fusión de STD en el terminal amino con la proteína foránea. Las proteínas probablemente se cruzan donde las membranas interior y exterior se encuentran, una vez dentro del estroma del STD es procesado por una metaloproteasa de 140 kDa (2).

Los bordes izquierdo y derecho flanquean la región del ADN que va a ser transferido a la célula de la planta, el ADN-T. Las regiones de fijación del andamiaje, también conocidas como regiones de unión de la matriz, están a ambos lados del transgén. Se cree que estas regiones que interactúan con las proteínas de la matriz nuclear formando dominios de bucle en el ADN se ha demostrado que aumentan la expresión con la inserción en un plásmido (3). La expresión del transgén es controlada por un promotor dual del CaMV P35S, con un potenciador transcripcional duplicado. Se ha demostrado que este promotor aumenta la expresión sobre el promotor único del CaMV tradicional P35S (4). La señal de poliadenilación del gen para P35S se fusiona con el extremo del gen foráneo; esto estabiliza los transcritos de ARN. La replicación del plásmido en *Agrobacterium* se inicia en el origen de replicación de RK2. Debido al bajo número de copias del plásmido en *Agrobacterium*, el vector puede ser replicado alternativamente en *Escherichia coli* utilizando el origen de replicación de ColEI (5). El desarrollo de resistencia por una cantidad de *Agrobacterium* a la ampicilina ha conducido a la fusión de resistencia a la carbenicilina y a la ampicilina en el gen *bla*. La ampicilina se utiliza como un marcador en *E. coli* con carbenicilina como un marcador en *Agrobacterium*.

La clonación de todos los genes en sus respectivos vectores se hizo utilizando el par iniciador aplicable. El ORF de saL2 se amplificó con el par iniciador F L2-ERH y R L2-pTRAc (Tabla 1). El par iniciador de F pL2-pTRAc y R pL2-pTRAc fue utilizado para amplificar el ORF de pL2, y el par F-hL2-pTRAc y R hL2-pTRAc se utilizó para amplificar el ORF de hL2 para facilitar la clonación en pTRAc. Los fragmentos de 1,4 kb fueron clonados en pGEM®-T easy (Promega) y se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la PCR. Se cortó saL2 con las enzimas de restricción BspHI y XbaI y se subclonó en los sitios Afl III y XbaI de pTRAc haciendo al plásmido pTRA-saL2-C. Las enzimas de restricción BspHI y BamHI fueron utilizadas para cortar pL2 que fue subclonado en los sitios BamHI y Afl III de pTRAc haciendo al plásmido pTRA-pL2-C. hL2 fue clonado utilizando las enzimas de restricción XbaI y BspHI para elaborar al plásmido pTRA-hL2-C.

Con el fin de clonar saL2 en pTRAc-ERH, se amplificó el ORF de saL2 con el par iniciador F L2-ERH y R L2-ERH (Tabla 1), y se clonó en los sitios Nco I y NotI de pTRAc-ERH utilizando BspHI y NotI, haciendo al plásmido pTRA-saL2-E. Del mismo modo el ORF de hL2 fue clonado en pTRAc-ERH utilizando el par iniciador F hL2 pTRAc y R hL2-pTRA E.

TABLA 1. Los iniciadores utilizados en la PCR con su secuencia y los sitios de restricción a los cuales se unen

| Nombre del iniciador | Secuencia   | Sitios de restricción subrayados |
|----------------------|---|----------------------------------|
| F L2-ERH             | G <u>TCATGAG</u> ACACAAACGTTCTGCAAAAG             | BspHI                            |
| R 1.2-ERH            | AAGCGGCCGCGGCAGCCAAAGAGACATC                      | NotI                             |
| R L2-pTRAc           | AATCTAGACTAGGCAGCCAAAGAGAC                        | XbaI                             |
| F L2-Plast           | AA <u>ACGCGT</u> TAGGTGCATGAGACACAAACGTTCTGCAAAAC | MluI                             |
| F pL2-pTRAc          | AATCATGAGACATAAGAGATCTGCTAAG                      | BspHI                            |
| R pL2-pTRAc          | CGGGATCCCTAAGCAGCAAGAGAAACATC                     | BamHI                            |
| F pL2-cTP            | GG <u>ACGCGT</u> TAGGTGCATGAGACATAAGAGATCTGC      | MluI                             |
| F hL2-pTRAc          | ATTCATGAGGCACAAGAGGAGCGCC                         | BspHI                            |
| R hL2-pTRAc          | ATTCTAGATCAGGCGGCCAGGCTCAC                        | XbaI                             |
| F hL2-pTRA-P         | AT <u>ACGCGT</u> TAGGTGCATGAGGCACAAGAGGAGC        | MluI                             |
| R hL2-pTRA-E         | ATGCGGCCGCGGCCAGGCTCACGTC                         | NotI                             |

Las secuencias destacadas en rojo indican el codón de inicio del ORF de L2

Las secuencias destacadas en azul indican el codón de detención del ORF de L2

5 Para la clonación en pTRAc-rbcs1-cTP, saL2, pL2 y hL2 se amplificaron por PCR con los pares iniciadores F L2-Plast y R L2-pTRAc, F pL2-cTP y R pL2-pTRAc, y F hL2-pTRA-P y R hL2-pTRAc respectivamente (Tabla 1). Se clonaron adicionalmente hL2 y saL2 utilizando enzimas MluI y XbaI en los sitios MluI y XbaI de pTRAc-rbcs1-cTP, formando el plásmido pTRA-saL2-P y pTRA-hL2-P. MluI y BamHI se utilizaron para clonar pL2 en los sitios MluI y BamHI de pTRAc-rbcs1-cTP, creando pTRA-pL2-P.

El clon pTRA-hL2-A fue elaborado por medio de la clonación del mismo fragmento BspHI y XbaI utilizado para elaborar pTRA-hL-C y clonar en el fragmento BspHI - XbaI de pTRAc-ERH

## 10 Generación de *Agrobacterium* recombinante

15 El *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 fue proporcionado por Rainer Fischer (Instituto Fraunhofer de Biología Molecular y Ecología Aplicada IME 1 Aachen, Alemania). La cepa GV3101 contiene el plásmido auxiliar, pMP90RK, que contiene los genes cruciales *vir* (5). Los vectores pTRA, como se mencionó anteriormente, se puede replicar en *E. coli*, así como en *Agrobacterium*. Se clonaron primero los constructos del vector en las células DH5 $\alpha$ , que son más fáciles de cultivar y tienen un mayor número de copias del plásmido en comparación con *Agrobacterium* (5). Se cultivaron células de *Agrobacterium* GV3101 hasta fase logarítmica de 0,8 OD<sub>600</sub> a 26° C con agitación, en caldo Luria (LB) que contenía antibióticos; 50  $\mu$ g/ml de rifampicina (Rif) y 30  $\mu$ g/ml de kanamicina (Kan). Las células se hicieron electrocompetentes por medio de lavado 3 veces con agua Milli-Q y se resuspendieron en 1/20 del volumen de cultivo con glicerol al 10%. Se determinó la concentración de ADN del plásmido aislado de células DH5 $\alpha$  por espectrometría UV a 260 nm. Se mezcló el ADN del plásmido (400 ng) con 100  $\mu$ l de células electrocompetentes GV3101 en una cubeta de 0,1 cm (BIORAD®), y electroporación utilizando los siguientes parámetros: 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1,5 kV (Gene Pulse, BioRad®). Después de incubación a 26° C en caldo Luria (LB) durante 1 hora se sembraron en placa las células sometidas a electroporación sobre agar Luria (LA), que contenía 50  $\mu$ g/ml de Rif, 30  $\mu$ g/ml de Kan, y 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina (Carb) y se desarrollaron a 26° C durante 3 - 4 días.

25 Se determinó éxito de la transformación tanto por PCR de la colonia, o por análisis con enzimas de restricción. Debido al bajo número de copias del plásmido en *Agrobacterium*, se extrajo el plásmido de las colonias exitosamente electroporadas de GV3101 y transformó en *E. coli* para obtener suficiente ADN para el análisis de

restricción. Esto se logró mediante la inoculación de LB que contenía Rif, Kan, y Carb con colonias de *Agrobacterium* que habían crecido a 26° C sobre agar Luria. Las células competentes DH5α se transformaron con el ADN aislado del plásmido a partir del *Agrobacterium* y se sembró en placa sobre LA con 100 µg/ml de ampicilina incubada a 37° C O/N. Se utilizaron cinco colonias de DH5 α por cada colonia viable de *Agrobacterium* para inocular LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina que se desarrollaron a 37° C hasta la fase logarítmica. Se utilizaron los cultivos para la preparación a pequeña escala de ADN del plásmido y se llevó a cabo un análisis de restricción por digestión para determinar si el inserto estaba presente. Se elaboraron patrones de glicerol de la colonia adecuada de *Agrobacterium*, se elaboraron nueve cepas de *Agrobacterium* GV3101 para L2 que contenían los plásmidos: pTRA-saL2-E, pTRA-saL2-C, pTRA-saL2-P, pTRA-pL2-C, pTRA-pL2-P, pTRA-hL2-A, pTRA-hL2-C, pTRA-hL2-E, y pTRA-hL2-P (Tabla 2).

Líneas de la planta

Se cultivaron *Nicotiana benthamiana* de tipo silvestre bajo condiciones de luz durante 16 h, y de oscuridad durante 8 h a 22° C. Se utilizaron las plantas 14 - 28 días después de haber sido trasplantadas de las bandejas de plántulas a macetas.

15 Preparación de *Agrobacterium* para infiltración

El protocolo de la infiltración simula el proceso natural de inducción de *Agrobacterium* por acetosiringona. El medio de inducción y el de infiltración contienen ambos acetosiringona que activa los diferentes genes *vir* (6). Se cultivaron cepas de *Agrobacterium* a partir de las existencias de glicerol en LB con Rif, Kan, y Carb hasta una OD<sub>600</sub> entre 1 y 2 a 26° C. Se centrifugó el *Agrobacterium* a 5.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente (RT) y se resuspendió en medio de inducción (LB, ácido 2-[N-morfolino] etanosulfónico [MES] 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, acetosiringona 20 µM, pH 5,6, con el Rif, Carb, y Kan) y se desarrolló hasta una OD<sub>600</sub> de entre 1 y 2 a 26° C. Las células se centrifugaron a 5.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio de infiltración (MES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2,2105 g / l de sales de Murashige Skoog [MS], 35 g / l de sacarosa, acetosiringona 150 µM, a pH 5,6). Se midió la densidad óptica de las células y se diluyó hasta una OD<sub>600</sub> de entre 0,4 y 1,0. Las células se incubaron durante 3 horas en el medio de infiltración antes de la infiltración.

TABLA 2. Un resumen de las cepas de *Agrobacterium*, los vectores que se utilizaron, los plásmidos elaborados, los insertos que contienen y donde es enviada la proteína heteróloga

| Cepa de <i>Agrobacterium</i> | Vector de <i>Agrobacterium</i> | Nombre del Plásmido | Inserto     | Compartimiento celular al cual es enviado |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------|---|
| GV3101                       | pTRAc                          | pTRA-saL2-C         | HPV-16 saL2 | citoplasma                                |
| GV3101                       | pTRAc-ERH                      | pTRA-saL2-E         | HPV-16 saL2 | retículo endoplasmático                   |
| GV3101                       | pTRAc-rbcs1-CTP                | pTRA-saL2-P         | HPV-16 saL2 | cloroplasto                               |
| GV3101                       | pTRAc                          | pTRA-pL2-C          | HPV-16 pL2  | citoplasma                                |
| GV3101                       | pTRAc-rbcs1-CTP                | pTRA-pL2-P          | HPV-16 pL2  | cloroplasto                               |
| GV3101                       | pTRAc                          | pTRA-hL2-C          | HPV-16 hL2  | citoplasma                                |
| GV3101                       | pTRAc-A                        | pTRA-hL2-A          | HPV-16 hL2  | espacio apoplástico                       |
| GV3101                       | pTRAc-ERH                      | pTRA-hL2-E          | HPV-16 hL2  | retículo endoplasmático                   |
| GV3101                       | pTRAc-rbcs1-CTP                | pTRA-hL2-P          | HPV-16 hL2  | cloroplasto                               |
| *GV3101                      | pTRAc                          | pTRA-HL1            | HPV-16 HL1  | citoplasma                                |
| *GV3101                      | pTRAc                          | pTRA-p19            | p19         | citoplasma                                |

(continuación)

| Cepa de <i>Agrobacterium</i>                                   | Vector de <i>Agrobacterium</i> | Nombre del Plásmido | Inserto | Compartimiento celular al cual es enviado                                   |
|--|--------------------------------|---------------------|---------|---|
| *Cepas de <i>Agrobacterium</i> suministradas por James MacLean |                                |                     |         |   |
|  |                                |                     |         | ORF de L2 de tipo silvestre del HPV-16 saL2.                                |
|  |                                |                     |         | ORF de L2 del HPV-16 pL2 optimizado para expresión en <i>Nicotiana</i> .    |
|  |                                |                     |         | ORF de L1 de tipo silvestre del HPV-16 saL1b.                               |
|  |                                |                     |         | ORF de L1 del HPV-16 hL1 optimizado para expresión en <i>Homo sapiens</i> . |

## Procedimiento de infiltración

- 5 Un gen para L1 del HPV-16 optimizado de mamífero en GV3101 clonado en el vector dirigido al citoplasma (pTRA-hL1) fue donado amablemente por el Dr. James MacLean (UCT, Ciudad del Cabo, Sudáfrica). Las cepas de *Agrobacterium* GV3101 que contenían los constructos L1 o L2 se infiltraron ya sea solas o mezcladas con cantidades iguales de GV3101 (pTRA-p19) que codifica para un supresor silenciador p19; esta cepa también fue donada por el Dr. James MacLean (UCT, Ciudad del Cabo, Sudáfrica). Se utilizaron dos protocolos de infiltración diferentes: infiltración por inyección o infiltración al vacío. Para la infiltración por inyección se utilizó una jeringa de 2 ml para inyectar el *Agrobacterium* suspendido en un medio de infiltración en los espacios de aire abaxiales de hojas de *N. benthamiana*.

- 10 Para la infiltración al vacío se suspendieron plantas enteras de *N. benthamiana* en medio para infiltración que contenía las cepas de *Agrobacterium* y se las colocó al vacío a 60 mbar durante 5 min. *Agrobacterium* fue infiltrada con la liberación del vacío. El protocolo difiere de aquel utilizado por Vaquero et al. (1999) (7). Se desarraigaron las plantas enteras, se las infiltró al vacío y plantó nuevamente. Vaquero et al. (1999) infiltraron al vacío hojas enteras de plantas Petite Havana. El uso de plantas enteras no sólo es más fácil, sino que se pueden administrar nutrientes adicionales a las hojas para aumentar la expresión del transgén. Las plantas se incuban posteriormente a 28° C en una habitación con control de humedad.

- 20 Extracción de proteína y transferencias tipo Western

- 25 Se realizó la homogeneización moliendo del material en nitrógeno líquido. Se suspendió la muestra homogeneizada en 2 µl/mg de urea 8 M. Se separaron los restos celulares y otras moléculas más grandes por medio de dos rondas de centrifugación (10.000 x g, 10 min a temperatura ambiente). Se añadió el amortiguador de carga dodecil sulfato de sodio (SDS)-PAGE a las muestras e hirvió durante 10 minutos. Se cargó la muestra sobre SDS-PAGE al 10% y corrió a 100 V durante ~ 2,5 h. La proteína fue transferida a una membrana de nylon (Nitrobind, Fundida, Nitrocelulosa pura, 0,45 micras, OSMONICS INC.) por medio de transferencias semisecas a 15 V, 400 mA, durante 2 h (Trans Blot® semisecco, BioRad® con la fuente de alimentación Electrophoresis Power Supply, AMERSHAM®). El éxito de la transferencia se midió mediante tinción con azul Coomassie del gel después de la transferencia. La membrana fue bloqueada O/N en leche desnatada al 5% suspendida en PBS con Tween-20 al 0,05%. La membrana se incubó durante otras 4 horas a temperatura ambiente con antisuero policlonal de conejo surgido contra L2 del HPV-16 (1:3.000), anticuerpos monoclonales de ratón contra L1 del HPV-16 (J4) (1:5.000). Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma® - Aldrich) diluidos hasta 1:10.000 durante 2 horas a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) elaborado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche® Diagnostics).

Expresión de L2 por medio de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*.

- 40 Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* con todas las nueve cepas de *Agrobacterium* que contienen los diferentes ORF de L2. La expresión de L2 no pudo ser detectada por transferencias tipo Western de ninguna de las cepas que contenían el ORF de pL2 o el ORF de saL2 (datos no presentados). Esto podría ser debido al uso de codones como se ha publicado previamente para L1. (8) La expresión fue observada sin embargo cuando se expresa a partir de cualquiera de los clones que tienen el gen para hL2 (Fig. 15). Se observó una expresión similar de L2 a través del conjunto de vectores. Se observaron también cantidades similares de productos de degradación en los diferentes vectores. Esto indica que posiblemente L2 se localiza en la misma región de la célula de la planta a pesar de las

moléculas de señalización dentro del vector. Se esperaría un cierto grado de protección en particular por las proteínas dirigidas al cloroplasto. Estas cifras contradicen otros hallazgos realizados con estos vectores, por ejemplo, la expresión de L1 es notablemente menor con el vector destinado al ER que aquel de los vectores dirigidos al cloroplasto o al citoplasma. (Dr. James MacLean, comunicación personal)

5 L2 parece ser altamente expresado.

El material vegetal de cada infiltración se pesó y por lo tanto se añadió la misma cantidad de amortiguador (urea 8 M). Esto permite la posibilidad de determinar empíricamente el peso original del material vegetal que se cargó en un Western (Fig. 3). Esta inmunotransferencia mostró que L2 aún se puede detectar hasta 0,4 mg del material vegetal original. Sólo podemos especular la cantidad de L2 que está presente en relación con la proteína soluble total, se intentó un nuevo análisis por ELISA, pero fracasó debido a que sólo un anticuerpo policlonal estaba disponible.

Coexpresión de L1 y L2 en la misma región.

L2 y L1 fueron simultáneamente infiltrados de manera conjunta en plantas de *N. benthamiana*. La expresión tanto de L1 como de L2 pudo ser detectada en estas muestras de hojas, sin embargo a partir de estos resultados no es concluyente si L1 y L2 se expresan en la misma célula. La literatura sugiere que es más probable que se expresen en la misma célula, habiendo sido probado con expresión de anticuerpos con múltiples subunidades que las forman. (29)

Se ha demostrado que las respuestas contra L1 para producir anticuerpos de tipo específico, con el advenimiento de la vacunas GSK y HPV de Merck se ha abierto el camino para vacunas de segunda generación que muy probablemente incorporarán L2 y sus propiedades de neutralización cruzadas. La producción de proteínas heterólogas y en particular vacunas de subunidades en las plantas ha demostrado ser más rentable que otros sistemas de expresión. En conclusión, un enlace de estos dos ideales sencillos pero muy importantes podría conducir a lo más necesario en la lucha contra el cáncer de cuello uterino: una vacuna barata y eficaz.

#### Ejemplo 4

Proteína quimérica L1 del VPH expresada a niveles altos

25 El método descrito en WO2003/097673, cuyo documento se incorpora aquí como referencia, se utiliza para la expresión de alto nivel de proteínas quiméricas L1 del VPH como se describió aquí anteriormente.

#### FIGURAS

La especificación debe ser leída con referencia a las siguientes figuras en las cuales:

La Figura 1 muestra los vectores de *Agrobacterium* pTRAc, pTRAc-rcbs1-CTP y pTRAc-ERH.

30 La Figura 2 muestra a L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (HL1) (SEQ ID NO. 13).

Figura 3 muestra L1 del HPV-16 optimizado por codón humano (SYNL1) (SEQ ID NO. 14).

La Figura 4 muestra una transferencia tipo Western de muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* portador del gen para L1 del HPV-16. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* por inyección con un constructo de *Agrobacterium-L1*, o infiltradas conjuntamente con *Agrobacterium-L1* y *Agrobacterium* (pBIN-NSs). La transferencia tipo Western se realizó sobre extractos crudos de hoja 6 días después de la infiltración, utilizando anticuerpo monoclonal L1 anti-HPV-16 de H16.J4. Las muestras en los carriles 1 - 5 fueron de hojas infiltradas con *Agrobacterium* que porta los siguientes vectores: 1, pTRACTP-GFP; 2, pTRA-HL1; 3, pBIN-NSs y pTRA-HL1; 4, pTRACTP-HL1; 5, pBIN-NSs y pTRACTP-HL1.

40 La Figura 5 muestra la detección de L1 en muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* que porta al gen para L1 del VPH-16. Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* por medio de inyección con un constructo de *Agrobacterium-L1*, o infiltraron conjuntamente con *Agrobacterium-L1* y *Agrobacterium* (pBIN-NSs). Seis días después de la infiltración se evaluaron los extractos crudos de hojas por medio de un ELISA de captura de H16.V5.

45 La Figura 6 muestra una micrografía electrónica del extracto crudo de la planta de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* GV3101 (pTRACTP-HL1). Las VLP están indicadas por las flechas.



- 5 La Figura 7 muestra los miligramos de L1 del HPV-16 producidos en las plantas por agroinfiltración. Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron en una mezcla de un constructo *Agrobacterium*-L1, *Agrobacterium* (pBIN-NSs), y *Agrobacterium* (pTRA-GFP). Seis días después de la infiltración extractos se evaluaron los extractos crudos de hojas por medio de los ELISA de captura de los mAb H16.V5 y H16.J4. El nivel de L1 expresado como un % de la proteína soluble total (TSP) se muestra para constructos específicos.
- 10 La Figura 8 muestra los títulos de anticuerpo sistémico específicos de la VLP del HPV-16 inducidos en ratones BALB/ c después de una sola inmunización con un extracto crudo de planta/HL1. Tres días después de que las plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* fueran infiltradas al vacío con *Agrobacterium* (pTRA-HL1) y *Agrobacterium* (pBIN-NSs), se produjeron extractos concentrados de plantas, y utilizaron para ratones inmunizados. Los grupos control fueron inmunizados dos veces con 10 µg de las VLP producidas por baculovirus, o una vez con 1 µg de las VLP producidas por baculovirus. Se tomaron sueros 4 semanas después de la inmunización, se los diluyó en forma serial (agrupados por cada grupo de ratones) y utilizó en un ELISA contra las VLP de VPH-16. Los valores de OD a 492 nm fueron medidos y se registraron los resultados como el recíproco de la dilución más alta donde la OD es > 2x que la del sangrado previo.
- 15 La Figura 9 muestra los miligramos de L1 del HPV-16 L1 producidos por kg de material vegetal transgénico. Se transformaron plantas L. cv. Petite Havana SR1 de *N. tabacum* con *Agrobacterium* que porta el gen para L1 del VPH-16. L1 fue detectado en extractos crudos de hojas por medio de los ELISA de captura de los mAb H16.V5 y H16.J4. Se muestra el nivel L1 expresado como un % de TSP para constructos específicos.
- 20 La Figura 10 muestra un gen HA del gen de longitud completa optimizado por codón humano (H5, 1704 pb) del virus de la influenza A/Viet/Nam/1194/2004 (H5N1) (GenBank, acceso no. AY651333) (SEQ ID NO. 15).
- La figura 11 muestra un gen para HA optimizado por codón humano truncado en 23 aminoácidos (H5tr, 1635 pb). H5tr fue truncado desde el nucleótido 1597-1665 para eliminar su dominio de anclaje a la membrana (SEQ ID NO. 16).
- 25 La Figura 12 muestra la predicción de transmembrana para el gen de H5 (CBS Servidores Predicción, <http://www.cbs.dtu.dk/>).
- La Figura 13 muestra la transferencia tipo Western de muestras de hojas de *N. benthamiana* después de la infiltración con *Agrobacterium* portador de los genes para H5 o H5tr. Las muestras de *Agrobacterium* fueron las siguientes: 1, pTRA-H5; 2, pTRA-H5tr; 3, pTRACTP-H5; 4, pTRACTP-H5tr; 5, pTRAERH-H5; 6, pTRAERH-H5tr. El carril 7 contenía extracto no infiltrado de *N. benthamiana*.
- 30 La Figura 14 muestra los vectores de *Agrobacterium* utilizados en este estudio, es decir, pTRAc, pTRAc-ERH, pTRAc-rbcs1-cTP, y pTRAc-A. La barra de color azul claro indica el ADN-T que se transfiere a la célula de la planta en la transfección. El gen heterólogo se clonó en los vectores en el sitio de clonación múltiple (MCS). Los vectores de compartir una cantidad de características comunes indicadas por las regiones en gris. La región del ADN-T está flanqueada por el borde izquierdo (LB) y el borde derecho (RB). En cada extremo del MCS hay regiones de unión del andamiaje (SAR). La expresión del transgén está controlada por un promotor dual 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (P35SS CaMV) con la unión de la señal de poliadenilación del mismo gen del CaMV (pA35S). La replicación del vector en *Agrobacterium* se inicia en el ori RK2. Un sitio separado de iniciación de la replicación, ColE1, es usado en *E. coli*. El vector pTRAc contiene sólo un marcador de resistencia a antibióticos (*bla*) que permite la selección con ampicilina / carbenicilina. Los pTRAc-ERH, pTRAc-A, y pTRAc-rbcs1-cTP contienen un segundo marcador antibiótico (*nptII*) que permite la selección con kanamicina en plantas. El gen *nptII* es controlado por el promotor del gen para la nopalina sintasa de *Agrobacterium* (Pnos), el poliadenilación del mismo gen está unida a *nptII* (pAnos). pTRAc-ERH adicionalmente incluye una señal de secreción (LPH), una secuencia de la etiqueta His (His6) y una secuencia de la señal de retención del retículo endoplasmático (KDEL) secuencia abajo del MCS. pTRAc-rbcs1-cTP incluye una secuencia del péptido de señalización del cloroplasto (rbcs1-cTP) secuencia arriba del MCS.
- 35 40 45
- 50 La Fig. 15 muestra que la expresión de L2 puede ser detectada con cada uno de los cuatro vectores. *N. benthamiana* fue infiltrada en forma transitoria con la misma OD de *Agrobacterium* que contenía los diferentes vectores que tienen el gen para L2 humanizado. Estos son pTRA-hL2-A (hL2-A), pTRA-hL2-C (hL2-C), pTRA-hL2-E (hL2-E), y pTRA-hL2-P (hL2-P). Como material de control negativo de la planta que no había sido infiltrada con *Agrobacterium* también se extrajeron (-ve). Se utilizó L2 del HPV-16 expresado por *E. coli* como control positivo (+ve). Se extrajo material de la planta después de dos días (A) y cinco días (B) y se inmunotransfirió. Se sondaron las transferencias tipo Western utilizando el pAb-αL2 de conejo.
- 55 Fig. 16 muestra una cuantificación crudo de la cantidad de L2 presente en el material de la hoja después de la infiltración. Se infiltró *N. benthamiana* con la cepa de *Agrobacterium* que contiene el vector pTRA-hL2-C. Se extrajo el material de la planta cuatro días después de la infiltración. Se determinaron empíricamente diferentes cantidades

de material de la hoja (8 mg, 0,8 mg y 0,4 mg) y se cargó en un Western. Se sondaron las transferencias tipo Western utilizando el pAb- $\alpha$ L2 de conejo.

La Figura 17 muestra que L1 y L2 son expresados en forma conjunta en la misma región. Se infiltró *N. benthamiana* con la mismo OD de *Agrobacterium* que contenía el gen para L1 humanizado dirigido al citoplasma mezclado e infiltrado en forma conjunta con *Agrobacterium* que contenía el gen para L2 humanizado enviando también la proteína al citoplasma. Se extrajo el material de la planta que fue infiltrado en forma conjunta después de cuatro días y se inmunotransfirió (L1/L2). Se utilizó material vegetal no infiltrado como control negativo (-ve). Se cargó L2 expresado en *E. coli* y se corrió como un control positivo. Las inmunotransferencias se sondearon ya sea con mAb de ratón J4 ( $\alpha$ L1) o con Ab- $\alpha$ L2 policlonal de conejo ( $\alpha$ L2).

- 5
- 10 En esta especificación, donde se describe o bien se expone cualquier secuencia de acuerdo con la invención, la invención pretende abarcar secuencias de al menos 75% de homología, más preferiblemente al menos 77% de homología, incluso más preferiblemente al menos 80% de homología, incluso más preferiblemente al menos 82% de homología, incluso más preferiblemente al menos 85% de homología, incluso más preferiblemente al menos 87% de homología, incluso más preferiblemente al menos 90% de homología, incluso más preferiblemente al menos 92% de homología,
- 15 de homología, incluso más preferiblemente al menos 95% de homología, lo más preferible al menos 97% de homología.

#### Referencias

- 20 Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., y Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* 122, 101 - 108. Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Thompson, C. D., Castle, P. E., FitzGerald, P. C., Kruger, K. S., Lowy, D. R., y Schiller, J. T. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* 321, 205 - 216.
- 25 Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. E. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York).
- Shen, W. J. y Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 17, 8385.
- Somers, D. A. y Makarevitch, I. (2004). Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 126 - 131.
- 30 Studentsov, Y. Y., Schiffman, M., Strickler, H. D., Ho, G. Y., Pang, Y. Y., Schiller, J., Herrero, R., y Burk, R. D. (2002). Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1755 - 1760.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., y Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Lett.* 532, 75 - 79.
- 35 Twyman, R. M. (2004). *Host Plants, Systems and Expression Strategies of Molecular Farming*. In 'Molecular Farming'. (Eds. R. Fischer y S. Schillberg.) páginas 191 - 216. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim).
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449 - 459.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., y Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949 - 956.
- 40 Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X. Y., Crawford, L., Mclean, C. S., y Frazer, I. H. (1991). Identification of the Nuclear Localisation Signal of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein. *Virology* 185, 625 - 632.
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O., y Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11 - 28.
- Pagny, S., P. Lerouge, L. Faye, y V. Gomord. 1999. Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* 50(331): 157 - 164.
- 45 Cline, K. y R. Henry. Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. 1996. *Annu. Rev. of Cell Dev. Biol.* 12: 1 - 26.
- Nowak, W., M. Gawłowska, A. Jarmolowski, y J. Augustyniak. 2001. Effect of nuclear attachment regions on transgene expression in tobacco plants. *Acta Biochim Pol.* 48(3): 637 - 646.
- 50 Rukatsova, E., O. Zolova, N. Buryanova, V. Borisova, V. Bykova, y Y. Buryanova. 2003. *Russ. J. Genet.* 39(1): 41 -45.
- Koncz, C. y J. Schell. 1986. The Promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383 - 396.
- Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg, y R. Fischer. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11128 - 11133.
- 55 Biemelt, S., U. Sonnemald, P. Galmbacher, L. Willmitzer, y M. Müller. 2003. Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in Transgenic Plants. *J. Virol.* 77(17): 9211 - 9220.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir polipéptidos L1 del HPV en una planta que comprende las etapas de:
  - 5 - clonación de un gen para L1 del HPV o un ácido nucleico que codifica un equivalente funcional en un vector adaptado para dirigir un polipéptido expresado en el citoplasma a los cloroplastos presentes en la planta;
  - infiltrar al menos una porción de la planta con el vector o transformar tejido de la planta con el vector para expresar transitoriamente los polipéptidos L1 del HPV en el citoplasma y luego importar los polipéptidos L1 del HPV en los cloroplastos y / o para crear una planta transgénica en donde los polipéptidos L1 del HPV se expresan en el citoplasma y luego se importan en los cloroplastos;
  - 10 y
  - recuperar el polipéptidos L1 del HPV expresados por la planta.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde los polipéptidos L1 del HPV se seleccionan de entre el grupo que consiste de una proteína L1 del HPV; un péptido quimérico L1 del VPH fusionado a otro péptido antigénico del HPV; un péptido quimérico L1 del HPV fusionado a un péptido heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de células B o de células T, o sus equivalentes funcionales.
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las secuencias objetivo que codifican un polipéptido para dirigir al polipéptido L1 del HPV dese el citoplasma hasta el cloroplasto están incluidas en el vector.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el vector incluye promotores y otros reguladores o similares enlazados operativamente a la secuencia de codificación del vector.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde los vectores son vectores binarios.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 en donde los vectores son vectores binarios de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el gen para L1 del HPV; el gen quimérico para L1 del HPV fusionado a otro gen para el antígeno del HPV; o un gen quimérico para L1 del HPV fusionado a un gen heterólogo derivado de cualquier epítipo antigénico, específico de células B o de células T, es un gen optimizado para uso del codón.
- 30 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el gen optimizado humano es optimizado por un codón humano, optimizado por un codón de BCG u optimizado por un codón de la planta.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el gen para L1 del HPV o los genes de las quimeras L1 del HPV son modificados para ser deficientes en la señal de localización nuclear.
10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye la etapa de infiltración conjunta de la planta con una proteína supresora adaptada para inhibir el silenciamiento post-transcripcional del gen en una planta.
- 35 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la proteína supresora es la proteína NSs del virus del marchitamiento moteado del tomate o el p19 del virus de la atrofia del follaje del tomate.
12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye además la etapa de infiltración conjunta de la planta con un gen para L2 del HPV.
- 40 13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la infiltración se realiza mediante inyección directa o por vacío.
14. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la infiltración y / o transformación de la planta se logra con *Agrobacterium tumefaciens* que ha sido transformado para aceptar el vector.
15. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la planta se selecciona de entre *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*.
- 45 16. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la infiltración se lleva a cabo sobre las hojas de la planta.
17. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde la infiltración por inyección directa se

realiza sobre la región abaxial de la hoja.

18. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el gen para L1 del HPV o el ácido nucleico que codifica un equivalente funcional se selecciona a partir de las secuencias mostradas en las Figuras 2 y 3.

5 19. Un método para producir un polipéptido L1 del HPV en una planta en donde sustancialmente la planta completa se infiltra con un vector adecuado por medio de infiltración al vacío.

20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en donde el vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en la planta provocando que un polipéptido expresado incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los cloroplastos.

10 21. El uso de un vector en el cual se ha clonado un gen para L1 del HPV, en donde el vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en una planta para expresar ya sea en forma transitoria un polipéptido L1 del HPV en el citoplasma y luego importar el polipéptido del HPV dentro de los cloroplastos y/o para crear una planta transgénica donde el polipéptido L1 del HPV se expresa en el citoplasma y luego se importa dentro de los cloroplastos.

15 22. El uso de acuerdo a la reivindicación 21 en donde el vector se adapta a cloroplastos objetivo presentes en la planta provocando que un polipéptido expresado incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los cloroplastos.

20 23. Un vector dentro del cual se ha clonado un gen para L1 del HPV, en donde el vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en una planta para expresar ya sea en forma transitoria un polipéptido L1 del HPV en el citoplasma y luego importar el polipéptido L1 del HPV dentro de los cloroplastos y/o para crear una planta transgénica donde el polipéptido L1 del HPV se expresa en el citoplasma y luego se importa dentro de los cloroplastos.

24. Un vector de acuerdo con la reivindicación 23 en donde el vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en la planta provocando que un polipéptido expresado incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los cloroplastos.

25 25. Una planta transgénica, una parte o progenie de la misma que contiene una célula transformada con un vector adaptado a los cloroplastos objetivo presentes en la planta y que codifica un gen para L1 del HPV o ácido nucleico que codifica un equivalente funcional del mismo, de tal manera que un polipéptido L1 del HPV se exprese en el citoplasma y luego se importa dentro de los cloroplastos.

30 26. Una planta transgénica, una parte o progenie de la misma de acuerdo con la reivindicación 25 en donde el vector se adapta a los cloroplastos objetivo presentes en la planta provocando que un polipéptido expresado incluya una porción capaz de interactuar con las membranas tilacoidales de los cloroplastos.

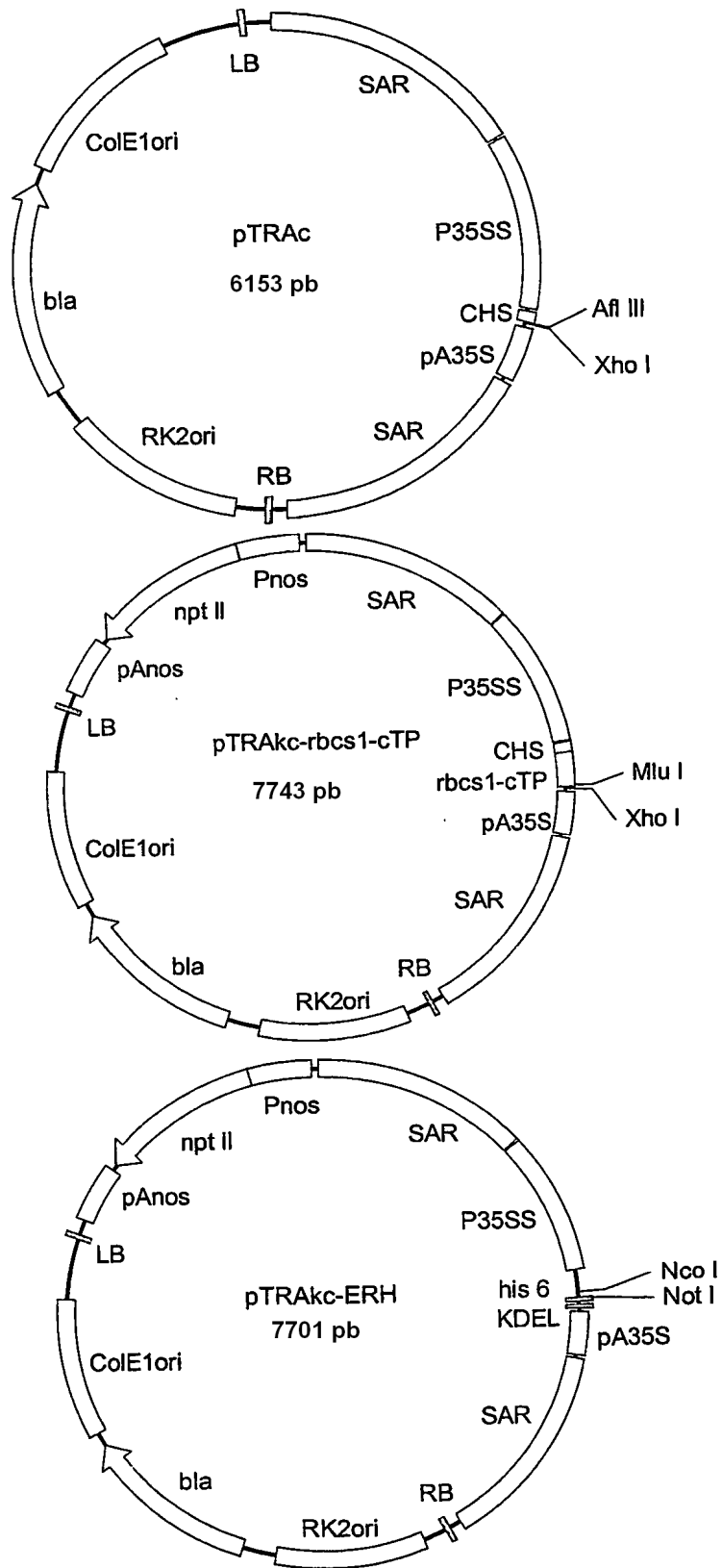


Figura 1.

```

1      ATGTCCCTGT GGCTGCCAG CGAGGCCACC GTGTACCTGC CCCCCGTGCC CGTGAGCAAG
61     GTGGTGAGCA CCGATGAGTA CGTGGCCCGG ACCAACATCT ACTACCACGC CGGCACCTCC
121    AGACTGCTGG CCGTGGGCCA CCCCTACTTC CCCATCAAGA AGCCCAACAA CAACAAGATC
181    CTGGTGCCCA AGGTGAGCGG CCTGCAATAC CGGGTGTTC AATCCACCT GCCCGACCCC
241    AATAAGTTCG GCTTCCCCGA CACCAGCTTC TACAACCCCG ACACCCAGAG ACTGGTGTGG
301    GCCTGCGTGG GCGTGGAGGT GGCAGAGGC CAGCCTCTGG GCGTGGGCAT CAGCGGCCAC
361    CCTCTGCTGA ACAAGCTGGA CGACACCGAG AACGCCAGCG CCTACGCCGC CAACGCCGGC
421    GTGGATAACA GAGAATGCAT CAGCATGGAC TACAAGCAGA CCCAGCTGTG CCTCATCGGC
481    TGCAAGCCCC CCATCGGCGA GCACTGGGGC AAGGGCAGCC CCTGCACCAA CGTGGCCGTG
541    AATCCTGGCG ACTGTCTCTC CCTGGAACTC ATCAACACCG TGATCCAGGA CGGCAGCATG
601    GTGGACACCG GCTTCGGCGC CATGGACTTC ACCACCTCC AGGCCAATAA GAGCGAGGTG
661    CCCCTGGACA TCTGCACCAG CATCTGCAAG TACCCCGACT ACATCAAGAT GGTGAGCGAG
721    CCCTACGGCG ATAGCCTGTT CTTCTACCTG CGGCGGGAGC AGATGTTCTG GCGCACCTG
781    TTCAACAGAG CCGGCACCGT GGGCAGAAC GTGCCGACG ACCTGTACAT CAAGGGCAGC
841    GGCAGCACCG CCAACCTGGC CAGCAGCAAC TACTTCCCTA CCCCAGCGG CTCCATGGTG
901    ACCAGCGACG CCCAGATCTT CAACAAGCCC TACTGGCTCC AGAGAGCCCA GGGCCACAAC
961    AATGGCATCT GCTGGGGCAA CCAGTGTTC GTGACCGTGG TGGATACCAC CCGGAGCACC
1021   AACATGTCCC TGTGCGCCGC CATCAGCACC AGCGAGACCA CCTACAAGAA CACCAACTTC
1081   AAGGAGTACC TGAGGCACGG CGAGGAGTAC GACCTCCAGT TCATCTTCCA GCTGTGCAAG
1141   ATCACCTCA CCGCCGACGT GATGACCTAC ATCCACAGCA TGAACAGCA CATCTGGAG
1201   GACTGGAACT TCGGCCTGCA GCCCTCTCT GCGGGCACCC TGGTGGAGGA GACCAGCTTC
1261   ATCGACCCG GAGCCCCCG ATGCCAGAAG CACACCCCTC CCGCCCCTAA GGAGGACCCC
1321   CTGAAGAAGT ACACCTTCTG GGAGGTGAAC CTGAAGGAGA AGTTCAGCGC CGACCTGGAC
1381   CAGTTCCCTC TGGGCAGAAA GTTCTGCTG CAAGCCGGCC TGAAGGCCAA GCCTAAGTTC
1441   ACCCTGGGCA AGAGAAAGGC CACCCCACC ACAAGCAGCA CCAGCACCAC CGCCAAGCGG
1501   AAGAAGCGCA AGCTGTGA

```

Figura 2.

```

1      ATGAGCCTTT GGCTCCCTAG CGAGGCCACT GTCTACCTCC CTCCTGTCCC AGTGTCTAAG
61     GTGGTGAGCA CTGATGAGTA TGTGGCAAGG ACCAACATCT ACTACCATGC AGGAACCTCT
121    AGGCTCCTTG CAGTGGGACA CCCCTACTTC CCTATCAAGA AGCCTAACAA CAACAAGATC
181    TTGGTGCCTA AGGTGTCAGG ACTCCAATAT AGGGTGTFTA GAATCCACCT CCCTGACCCC
241    AACAAGTTTG GTTTCCCTGA CACTCCTTC TACAACCCAG ACACCCAAAG GTTGGTGTGG
301    GCATGTGTGG GTGTGGAGGT GGTAGGGGT CAACCATGG GTGTGGGCAT CTCTGGCCAC
361    CCTCTCCTCA ACAAGTTGGA TGACACAGAG AATGCTTCTG CTTATGCAGC AAATGCAGGT
421    GTGGACAATA GGGAGTGCAT CTCTATGGAC TACAAGCAA CCCAATTGTG CCTCATTGGT
481    TGCAAGCCAC CTATTGGAGA GCATTGGGGC AAGGGATCCC CATGCACTAA TGTGGCAGTG
541    AACCCAGGTG ATTGCCCACC ATTGAGCTT ATCAACACAG TGATCCAAGA TGGTGACATG
601    GTGGACACTG GCTTTGGTGC TATGGACTTC ACTACCTCC AAGCTAACAA GTCTGAGGTG
661    CCATTGGACA TTTGCACCTC TATTTGCAAG TACCCAGACT ACATCAAGAT GGTGTCAGAG
721    CCATATGGAG ATAGCCTCTT CTTCTACTTG AGGAGGGAGC AAATGTTTGT GAGGCACCTC
781    TTCAATAGGG CTGGTACTGT GGGTGAAT GTGCCAGATG ACCTCTACAT CAAGGGCTCT
841    GGATCTACTG CAAACTTGGC AAGCTCCAAC TACTTCCCTA CCCCTTCTGG TTCTATGGTG
901    ACCTCTGATG CCCAAATCTT CAACAAGCCT TATTGGCTCC AAAGGGCACA AGGCCACAAC
961    AATGGCATTT GTTGGGGTAA CCAACTCTTT GTGACTGTGG TGGACACTAC AAGGAGCACC
1021   AACATGTCC TGTGTGCTGC CATCTCTACT TCAGAGACTA CCTACAAGAA CACTAACTTC
1081   AAGGAGTACC TTAGGCATGG AGAGGAGTAT GACCTCCAAT TCATCTTCCA ATTGTGCAAG
1141   ATCACCTCA CTGCAGATGT GATGACCTAC ATCCACTCTA TGAACTCCAC TATCTTGGAG
1201   GATTGGAAC TTTGGTCTCC ACCTCCCCA GGAGGCACCT TGGAGGACAC TTATAGGTTT
1261   GTGACCTCCC AAGCAATTGC TTGCCAAAAG CACACCCCTC CAGCACCTAA GGAGGACCCC
1321   CTTAAGAAGT ACACTTTTTG GGAGGTGAAC CTCAAGGAGA AGTTCCTCTG TGACTTGGAC
1381   CAATTCCTT TGGGAAGGAA GTTCTCTCTC CAAGCAGGAC TCAAGGCCAA GCCAAAGTTC
1441   ACCTTGGGAA AGAGGAAGGC TACCCCACC ACCTCCTCTA CCTTACCAC TGCTAAGAGG
1501   AAGAAGAGGA AGCTCTAA

```

Figura 3.

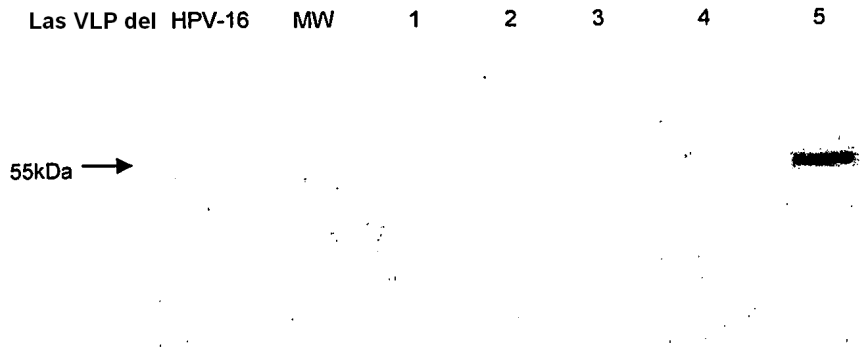


Figura 4.

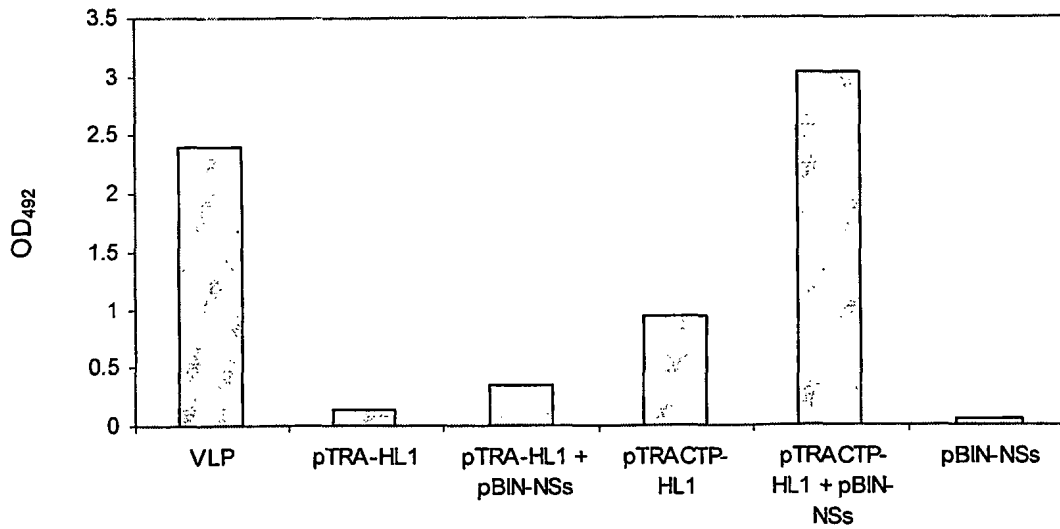


Figura 5.

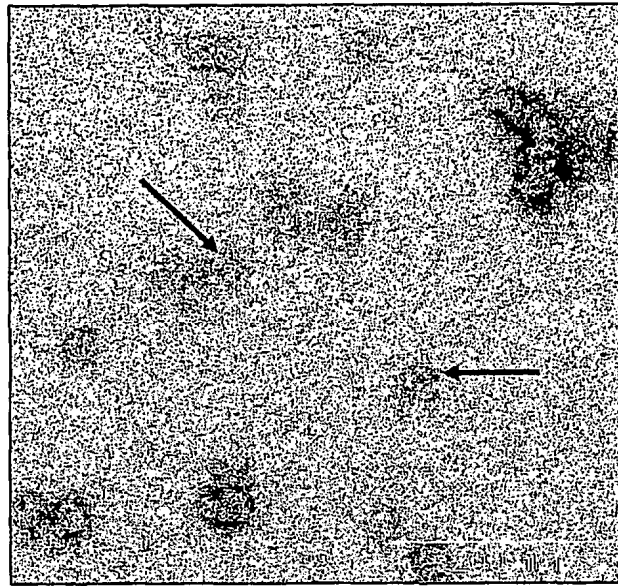


Figura 6.

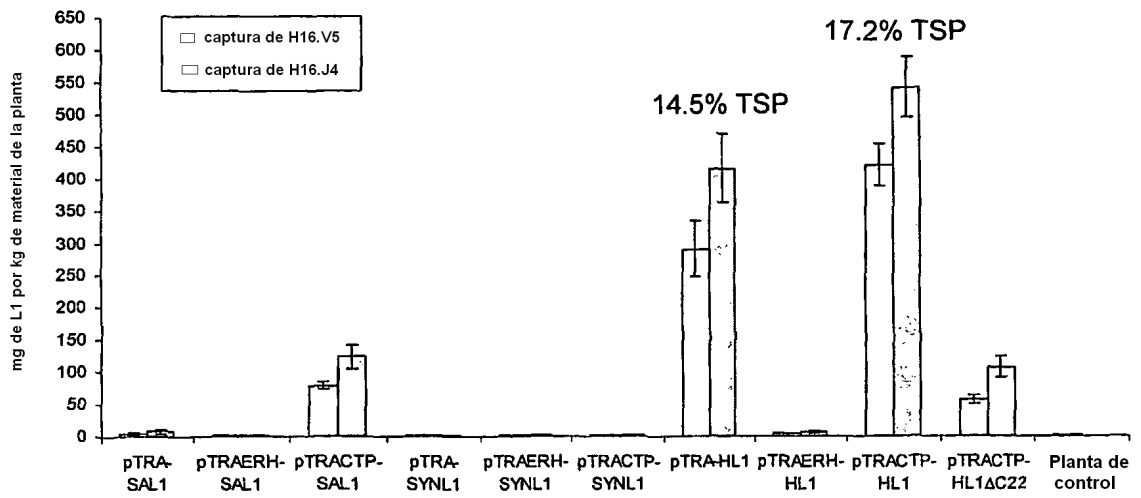


Figura 7.



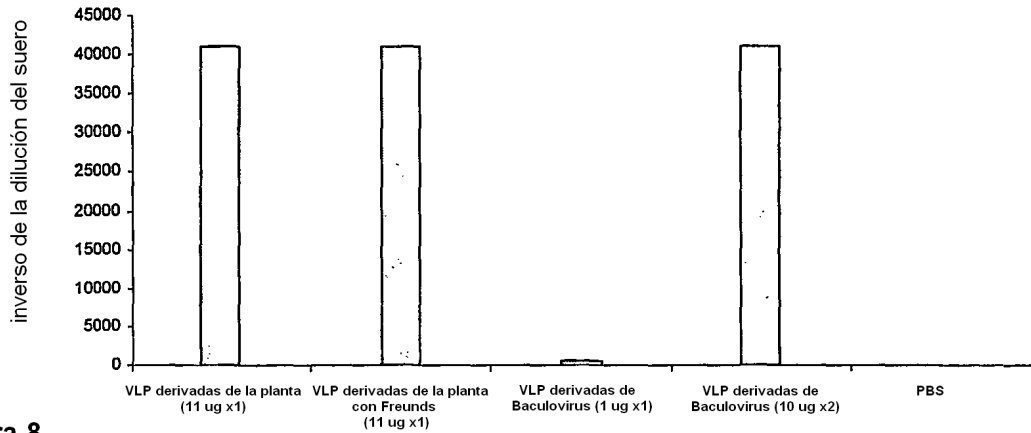


Figura 8.

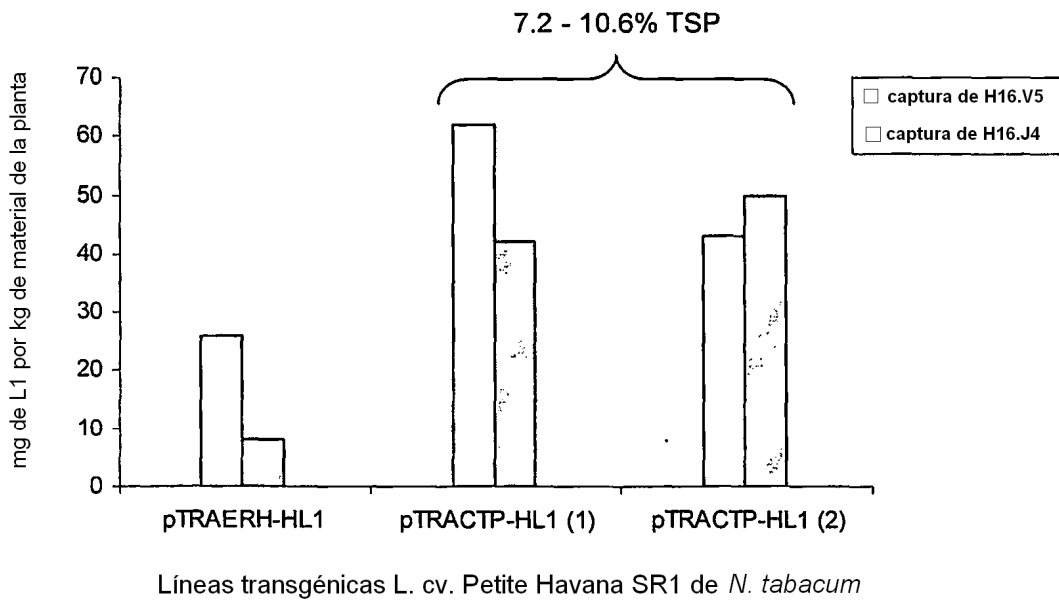


Figura 9.

**H5**

```

1      GGTACCGGAT CCACGCGTTA GGTCCATGGA AAAGATCGTG CTGCTGTTCG CCATCGTGAG
61     CCTGGTGAAG AGCGACCAGA TCTGCATCGG CTACCACGCC AACACAGCA CCGAGCAGGT
121    GGACACCATC ATGGAAAAAA ACGTGACCGT GACCCACGCC CAGGACATCC TGGAAAAGAC
181    CCACAACGGC AAGCTGTGCG ACCTGGACGG CGTGAAGCCC CTGATCCTGC GGGACTGCAG
241    CGTGGCCGGC TGGCTGCTGG GCAACCCCAT GTGCGACGAG TTCATCAACG TGGCCGAGTG
301    GAGCTACATC GTGGAGAAGG CCAACCCCGT GAACGACCTG TGCTACCCCG GCGACTTCAA
361    CGACTACGAG GAACTGAAGC ACCTGCTGTC CCGGATCAAC CACTTCGAGA AGATCCAGAT
421    CATCCCAAG  AGCAGCTGGT CCAGCCACGA GGCCAGCCTG GGCCTGAGCA GCGCCTGCC
481    ATACCAGGGC AAGTCCAGCT TCTTCCGGAA CGTGGTGTGG CTGATCAAGA AGAACAGCAC
541    CTACCCCAAC ATCAAGCGGA GCTACAACAA CACCAACCAG GAAGATCTGC TGGTCCTGTG
601    GGGCATCCAC CACCCCAACG ACGCCGCCGA GCAGACCAAG CTGTACCAGA ACCCCACCAC
661    CTACATCAGC GTGGGCACCA GCACCTGAA  CCAGCGGCTG GTGCCCGGA TCGCCACCCG
721    GTCCAAGGTG AACGGCCAGA GCGGCCGGAT GGAATTTTTC TGGACCATCC TGAAGCCCAA
781    CGATGCCATC AACTTCGAGA GCAACGGCAA CTTCATCGCC CCCGAGTACG CCTACAAGAT
841    CGTGAAGAAG GGCGACAGCA CCATCATGAA GAGCGAGCTG GAATACGGCA ACTGCAACAC
901    CAAGTGCCAG ACCCCTATGG GCGCCATCAA CAGCAGCATG CCCTTCCACA ACATCCACCC
961    CCTGACCATC GGCGAGTGCC CCAAGTACGT GAAGAGCAAC AGGTGGTGC TGGCCACCGG
1021   CCTGCGGAAC AGCCCCCAGC GGGAGCGGCG GAGGAAGAAG CGGGGCTGT TCGGCGCCAT
1081   CGCCGGCTTC ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGTGGTACG GCTACCACCA
1141   CAGCAATGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCGC CGACAAAGAG AGCACCAGAG AGGCCATCGA
1201   CGGCGTCACC AACAAGGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG AACACCAGT TCGAGGCCGT
1261   GGGCCGGGAG TTCAACAACC TGGAACGGCG GATCGAGAAC CTGAACAAGA AAATGGAAGA
1321   TGGCTTCCTG GACGTGTGGA CCTACAACGC CGAGCTGCTG GTGCTGATGG AAAACGAGCG
1381   GACCCTGGAC TTCCACGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAAGTGC GGCTGCAGCT
1441   GCGGGACAAC GCCAAAGAGC TGGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA AGTGCGACAA
1501   CGAGTGCATG GAAAGCGTGC GGAACGGCAC CTACGACTAC CCCAGTACA GCGAGGAAGC
1561   CCGCTGAAG  CGGGAGGAAA TCAGCGGCGT GAAACTGGAA AGCATCGGCA TCTACCAGAT
1621   CCTGAGCATC TACAGCACCG TGGCCAGCAG CCTGGCCCTG GCCATCATGG TGGCCGGCCT
1681   GAGCCTGTGG ATGTGCAGCA ACGGCAGCCT GCAGTGTAGA GCGGCCGCAT AATCTAGAGA
1741   GCTC

```

**Figura 10.**

**H5tr**

```

1      GGTACCGGAT CCACGCGTTA GGTCCATGGA AAAGATCGTG CTGCTGTTGCG CCATCGTGAG
61     CCTGGTGAAG AGCGACCAGA TCTGCATCGG CTACCACGCC AACAACAGCA CCGAGCAGGT
121    GGACACCATC ATGGAAAAAA ACCTGACCGT GACCCACGCC CAGGACATCC TGGAAAAGAC
181    CCACAACGGC AAGCTGTGCG ACCTGGACGG CGTGAAGCCC CTGATCCTGC GGGACTGCAG
241    CGTGGCCGGC TGGCTGCTGG GCAACCCCAT GTGCGACGAG TTCATCAACG TGCCCGAGTG
301    GAGCTACATC GTGGAGAAGG CCAACCCCGT GAACGACCTG TGCTACCCCG GCGACTTCAA
361    CGACTACGAG GAACTGAAGC ACCTGCTGTC CCGGATCAAC CACTTCGAGA AGATCCAGAT
421    CATCCCCAAG AGCAGCTGGT CCAGCCACGA GGCCAGCCTG GGCCTGAGCA GCGCCTGCC
481    ATACCAGGGC AAGTCCAGCT TCTTCCGGAA CGTGGTGTGG CTGATCAAGA AGAACAGCAC
541    GTACCCACC ATCAAGCGGA GCTACAACAA CACCAACCAG GAAGATCTGC TGGTCTGTG
601    CCGCATCCAC CACCCCAACG ACGCCGCCGA GCAGACCAAG CTGTACCAGA ACCCCACCAC
661    CTACATCAGC GTGGGCACCA GCACCCTGAA CCAGCGGCTG GTGCCCCGGA TCGCCACCCG
721    GTCCAAGGTG AACGGCCAGA GCGGCCGGAT GGAATTTTTC TGGACCATCC TGAAGCCCAA
781    CGATGCCATC AACTTCGAGA GCAACGGCAA CTTTCATCGCC CCCGAGTACG CCTACAAGAT
841    CGTGAAGAAG GGCAGACGCA CCATCATGAA GAGCGAGCTG GAATACGGCA ACTGCAACAC
901    CAAGTGCCAG ACCCCTATGG GCGCCATCAA CAGCAGCATG CCCTTCCACA ACATCCACCC
961    CCTGACCATC GCGAGTGCC CCAAGTACGT GAAGAGCAAC AGGCTGTTGC TGGCCACCCG
1021   CCTGCGGAAC AGCCCCCAGC GGGAGCGGCG GAGGAAGAAG CGGGGCCTGT TCGGCGCCAT
1081   CGCCGGCTTC ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGGTGGTACG GCTACCACCA
1141   CAGCAATGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCCG CGACAAAGAG AGCACCCAGA AGGCCATCGA
1201   CGGCGTCACC AACAAAGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG AACACCCAGT TCGAGGCCGT
1261   GGGCCGGGAG TTCAACAACC TGAACGGCG GATCGAGAAC CTGAACAAGA AAATGGAAGA
1321   TGGCTTCCTG GACGTGTGGA CCTACAACGC CGAGCTGCTG GTGCTGATGG AAAACGAGCG
1381   GACCTGGAC TTCCAGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAAGTGC GGCTGCAGCT
1441   GCGGGACAAC GCCAAAGAGC TGGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA AGTGCACAAA
1501   CGAGTGCATG GAAAGCGTGC GGAACGGCAC CTACGACTAC CCCCAGTACA GCGAGGAAGC
1561   CCGGCTGAAG CGGGAGGAAA TCAGCGGCGT GAAACTGGAA AGCATCGGCA TCTACCAGAT
1621   CATGTGCAGC AACGGCAGCC TGCAGTGTAG AGCGGCCGCA TAATCTAGAG AGCTC
    
```

Figura 11.

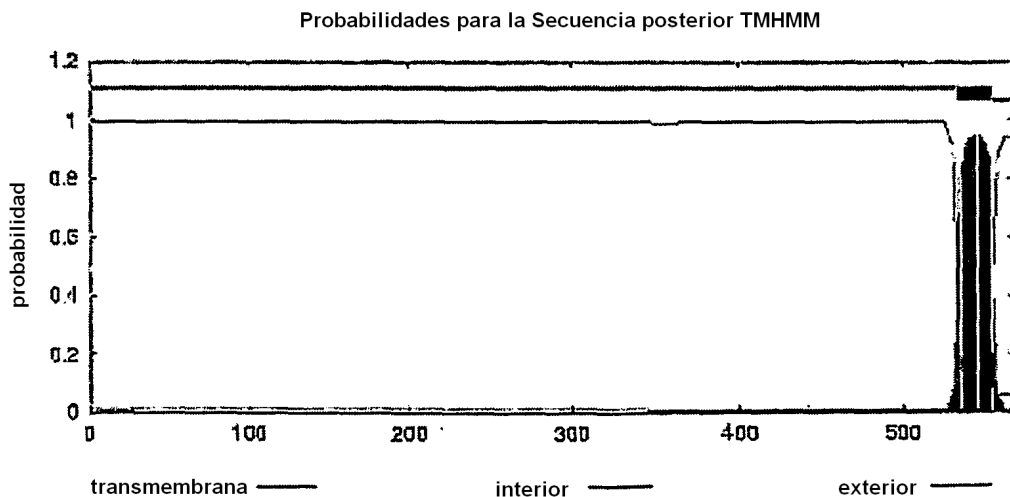


Figura 12.

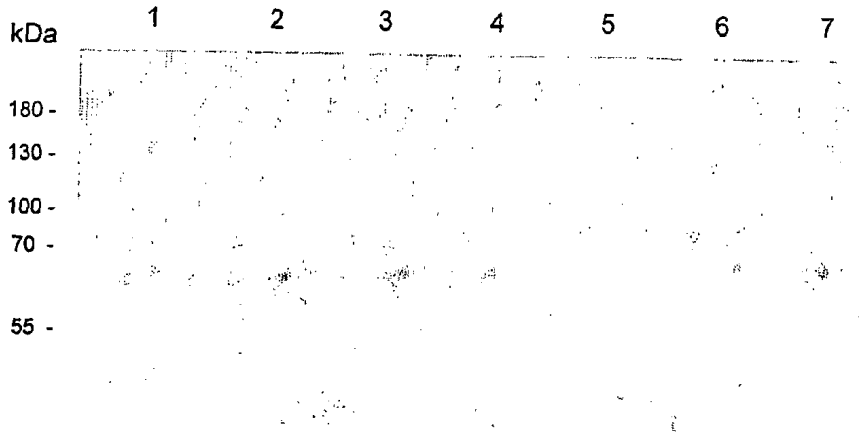


Figura 13.

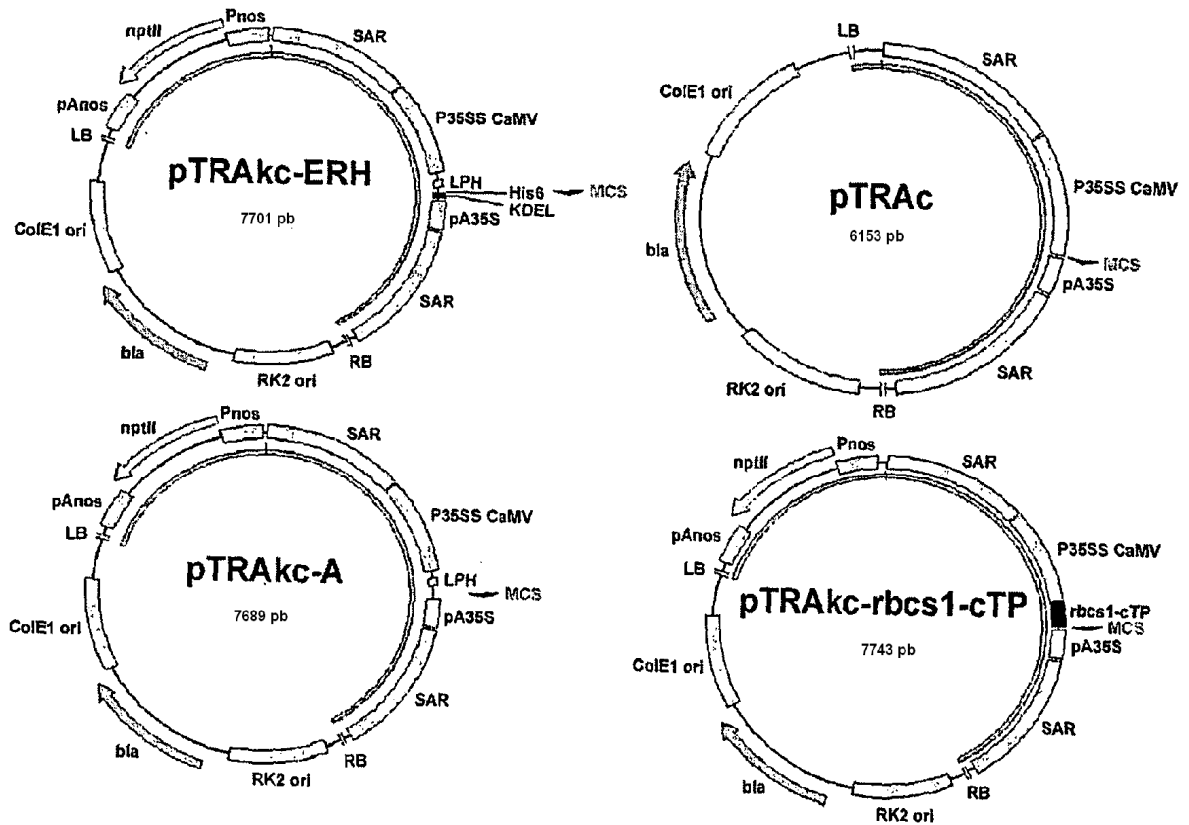


Figura 14.

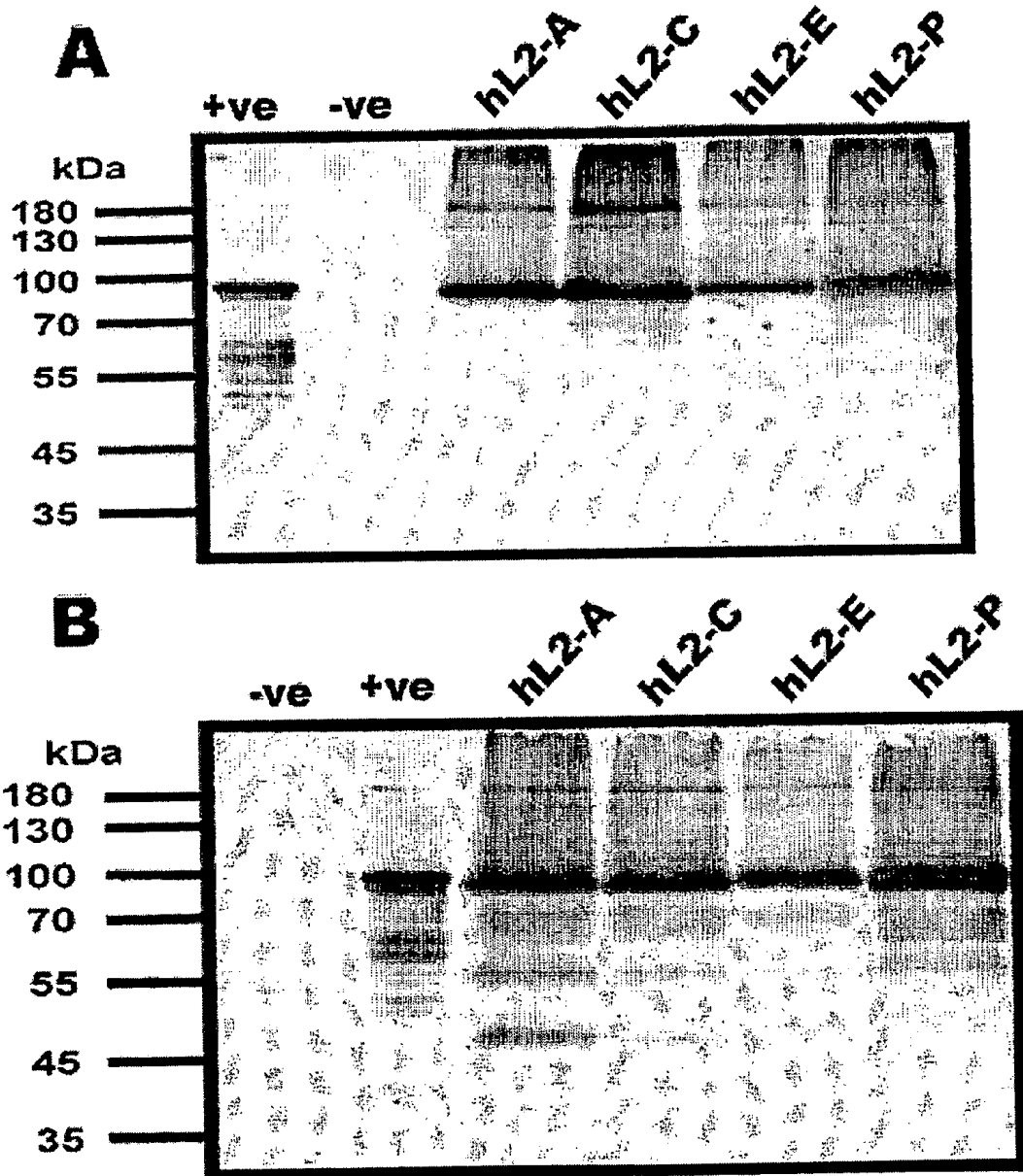


Figura 15.

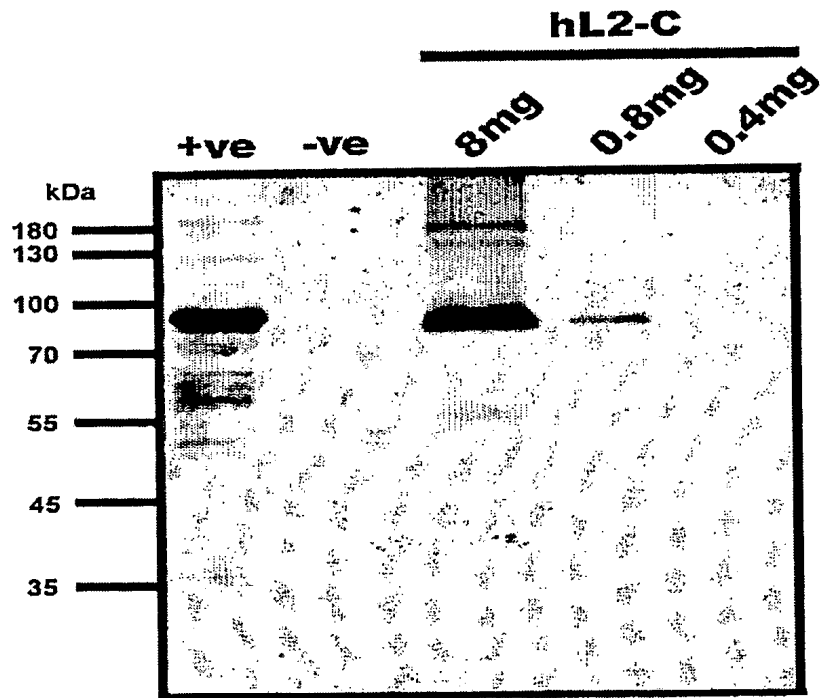


Figura 16.

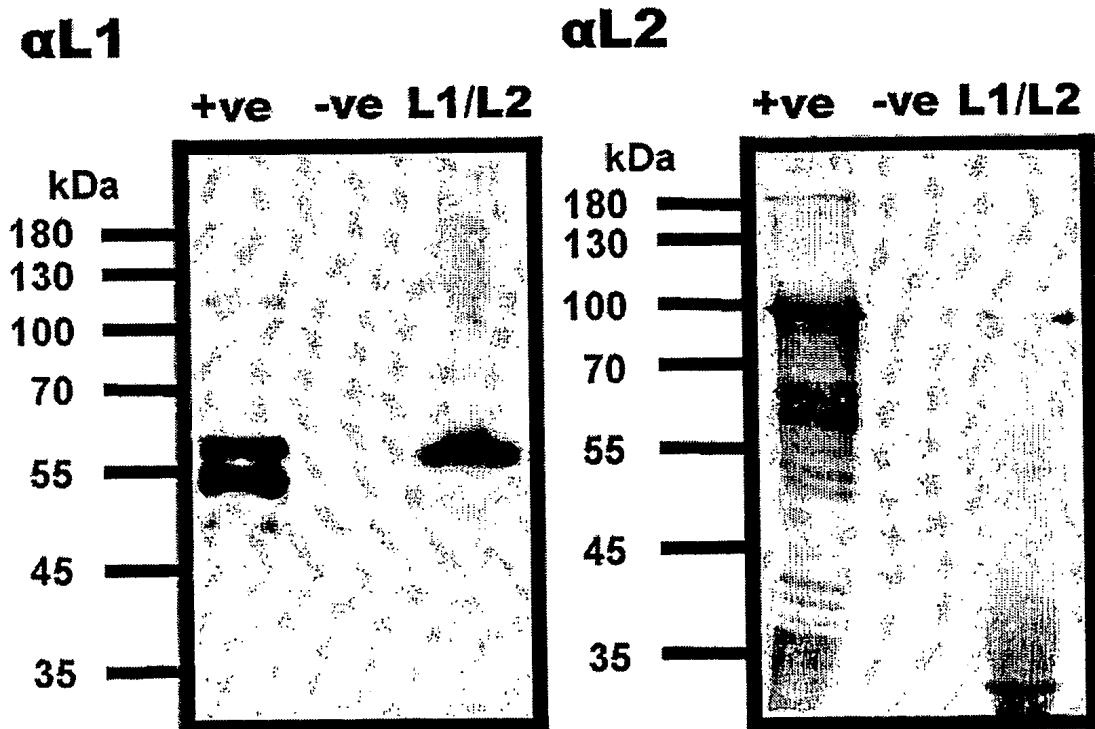


Figura 17.