

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 970**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07722918 .5**

96 Fecha de presentación: **23.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1994145**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Producción de proteínas biológicamente activas**

30 Prioridad:
23.02.2006 US 776391 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
ERA Biotech, S.A.
Parc Científic de Barcelona C/ Baldiri i Reixach
15-21
08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es:
HEIFETZ, Peter Bernard;
LLOMPART ROYO, Blanca;
MARZÁBAL LUNA, Pablo;
BASTIDA VIRGILI, Miriam;
LUDEVID MUGICA, María Dolores;
TORRENT QUETGLAS, Margarita;
O CONNOR, Kevin James;
PALLISSE BERGWERF, Roser y
LLOP, M^a Inmaculada

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

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).

ES 2 387 970 T3

DESCRIPCIÓN

Producción de proteínas biológicamente activas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional con número de serie 60/776.391 que se presentó el 23 de febrero de 2006.

10 Campo técnico

La presente invención contempla la producción de péptidos y proteínas recombinantes biológicamente activos, denominados colectivamente como polipéptidos, en células y organismos eucariotas como sistemas huésped. Más particularmente, se fusiona un polipéptido biológicamente activo a una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS, por sus siglas en inglés) que media la inducción de productos ensamblados de tipo cuerpos proteicos recombinantes (RPBLA, por sus siglas en inglés) para formar una proteína de fusión que se expresa de manera estable y se acumula en el sistema huésped como un RPBLA tras la transformación de las células huésped con un vector apropiado.

20 Antecedentes técnicos

La producción de proteínas recombinantes para usos terapéuticos, nutracéuticos o industriales ha disfrutado de un gran éxito a lo largo de la última década. La introducción de genes heterólogos que tienen una secuencia de nucleótidos deseada produce la expresión de un polipéptido o proteína que tiene la estructura primaria o secuencia de residuos de aminoácidos deseada correspondiente. Sin embargo, en muchos casos la proteína o polipéptido expresado tenía la secuencia de residuos de aminoácidos del material natural, pero carecía de la actividad biológica de ese material.

La actividad biológica, dada la estructura primaria apropiada del producto expresado, puede ser una función del producto que tiene el plegamiento y los enlaces de hidrógeno, Van der Waals, iónicos y disulfuro internos apropiados, y que también tiene una modificación postraducciona apropiada, tal como por ejemplo glicosilación. Por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro se produce espontáneamente en la luz del retículo endoplasmático (RE), pero no en el citosol de procariotas, lo que hace que células bacterianas tales como células *E. coli* sean malos huéspedes para la síntesis de proteínas de mamífero correctamente plegadas que se estabilizan normalmente mediante enlaces disulfuro. La formación de enlaces disulfuro puede producirse en el espacio periplasmático de *E. coli* en el que proteínas de tipo PDI son funcionales (Fernandez, *et al.*, 2001. Mol. Microbiol. Abr **40**(2):332-346), sin embargo el sistema oxi-redox no es muy eficaz.

Un caso particular se refiere a eritropoyetina (EPO), una proteína que estimula la producción de glóbulos rojos. La EPO recombinante se da a conocer en la patente estadounidense número 4.703.008 concedida a Lin. La patente da a conocer actividades para la proteína EPO expresada a partir de *E. coli*, *S. cerevisiae*, y células de ovario de hámster chino (CHO) y de riñón de mono verde africano (COS-1) de mamífero. Aunque los antiseros contra EPO reaccionaron de manera inmunológica con EPO expresada por cada tipo de célula, sólo las proteínas expresadas de células de mamífero mostraron actividad biológica *in vivo* sustancial como EPO, y concentraciones similares mediante ensayo de anticuerpos, ensayos *in vitro* e *in vivo*. La proteína expresada por mamíferos es la usada para tratar seres humanos.

Se cree que esas diferencias en la actividad biológica eran una función de la glicosilación ya que *E. coli*, un procarionte, no puede glicosilar sus proteínas expresadas. Las células de levaduras son eucariotas, pero su patrón de glicosilación para proteínas secretadas es diferente al de los mamíferos. Por otra parte, las células CHO y COS-1 usadas para proporcionar proteína con actividad biológica sustancial eran de mamífero y la proteína expresada a partir de las mismas fue útil. Estudios publicados de EPO glicosilada y no glicosilada indican que la glicosilación desempeña un papel crítico en la estabilización de la eritropoyetina frente a condiciones desnaturizantes. Narhi *et al.*, (1991) J. Biol. Chem. **266**(34):23022-23026. Además, se ha descrito que la vida útil *in vivo* y la actividad de EPO pueden relacionarse con la glicosilación de la molécula.

Por tanto, se prefieren enormemente las células eucariotas para la producción recombinante de proteínas útiles terapéuticas, industriales y otras de origen eucariota. Se ha mostrado que diferentes células y organismos eucariotas pueden producir productos terapéuticos basados en proteínas. Desafortunadamente, los elevados costes derivados con frecuencia de bajos niveles de producción de proteínas recombinantes y/o de los procedimientos de aislamiento y purificación de proteínas, pueden invalidar su aplicación industrial. Se realiza una investigación activa para mejorar tanto los niveles de producción como los procedimientos de purificación mediante diferentes enfoques.

Una manera de mejorar la eficacia del aislamiento de proteínas recombinantes es por medio de concentración intracelular. Uno de estos enfoques es la agregación al azar de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión no secretados que pueden separarse de células lisadas mediante técnicas de purificación basadas en densidad. Los

cuerpos de inclusión son depósitos de proteínas amorfos encontrados en bacterias. Estudios de caracterización estructural mostraron que la naturaleza insoluble de los cuerpos de inclusión puede deberse a interacciones intermoleculares hidrófobas de proteínas con plegamiento no nativo (Seshadri *et al.*, 1999, *Methods Enzymol.* **309**:559-576). La estrategia general usada para recuperar proteínas activas a partir de cuerpos de inclusión requiere la solubilización de la proteína para romper los agregados al azar seguido por una o más etapas de replegamiento químico. Esto es un problema importante que debe solucionarse dado que la eficacia de renaturalización de proteínas desnaturalizadas puede estar limitada, principalmente si la proteína contiene enlaces disulfuro (Clarc, Ed., Abr. 2001 *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**(2):202-207).

Más particularmente, se usan desnaturalizantes fuertes tales como alta concentración de agentes caotrópicos (es decir urea y clorhidrato de guanidinio) para solubilizar proteínas no plegadas que se acumulan en agregados. Posteriormente los desnaturalizantes se eliminan mediante diálisis en un intento de replegar la proteína en una conformación natural. La actividad biológica de tales proteínas replegadas es normalmente muy inferior a la de la proteína con forma nativa.

Los cuerpos proteicos (PB, por sus siglas en inglés) son estructuras naturales en ciertas semillas de plantas que han evolucionado para concentrar proteínas de reserva intracelularmente en células eucariotas al tiempo que conservan un plegamiento correcto y actividad biológica. Los cuerpos proteicos (PB) comparten algunas de las características de los cuerpos de inclusión de bacterias. Son densos y contienen una alta cantidad de proteínas agregadas que están estrechamente empaquetadas mediante interacciones hidrófobas [Momany *et al.*, 2006 *J Agric. Food Chem.* **2** 5Ene; **54**(2):543-547 y Garrat, *et al.*, 1993 *Proteins Ene*; **15**(1):88-99]. Además, la presencia de una gran cantidad de enlaces disulfuro en algunas de las PBIS, tales como por ejemplo RX3, [Ludevid, *et al.*, 1984 *Plant Mol. Biol.* **3**:227-234 y Kawagoe *et al.*, 2005 *Plant Cell* **17**(4):1141-1153], que están probablemente implicadas en la formación y estabilización de PB, podría representar una dificultad adicional para producir una proteína con plegamiento nativo biológicamente activa, particularmente una proteína que contiene residuos de cisteína.

Por tanto, la observación de actividad biológica sin necesidad de replegamiento y renaturalización de una amplia variedad de proteínas producidas en PB sintéticos en huéspedes eucariotas distintos de levaduras fue inesperada.

Se ha desarrollado una nueva tecnología basada en la fusión de un dominio de proteína de reserva de semillas de plantas con la proteína de interés (documento WO 2004/003207) para aumentar la estabilidad y acumulación de proteínas recombinantes en plantas superiores. Estas proteínas de reserva son específicas para semillas de plantas en las que se acumulan de manera estable en cuerpos proteicos (Galili *et al.*, 1993, *Trends Cell Biol* **3**:437-442).

Las proteínas de reserva se insertan en la luz del retículo endoplasmático (RE) mediante un péptido señal y se ensamblan o bien en el retículo endoplasmático desarrollando orgánulos específicos denominados cuerpos proteicos derivados de RE (RE-PB) o bien en vacuolas de reserva de proteína (PSV) (Okita *et al.*, 1996 *Annu. Rev. Plant Physiol Mol. Biol.* **47**:327-350; Herman *et al.*, 1999 *Plant Cell* **11**:601-613; Sanderfoot *et al.*, 1999 *Plant Cell* **11**:629-642). También se ha descrito que proteínas de reserva recombinantes de longitud completa se ensamblan en orgánulos de tipo PB en sistemas huésped distintos de plantas tales como ovocitos de *Xenopus*.

Se ha descrito la expresión de prolaminas de cereales (las proteínas de reserva de cereales más abundantes) en ovocitos de *Xenopus* tras la inyección de los ARNm correspondientes. Se ha usado este sistema como modelo para estudiar las propiedades de selección como diana de estas proteínas de reserva (Simon *et al.*, 1990, *Plant Cell* **2**:941-950; Altschuler *et al.*, 1993, *Plant Cell* **5**:443-450; Torrent *et al.*, 1994, *Planta* **192**:512-518) y para someter a prueba la posibilidad de modificar la α -zeína de 19 kDa, una prolamina del maíz, introduciendo los aminoácidos esenciales lisina y triptófano en su secuencia, sin alterar su estabilidad (Wallace *et al.*, 1988, *Science* **240**:662-664).

También se han producido zeínas, el grupo complejo de prolaminas del maíz, en levadura con diversos objetivos. Coraggio *et al.*, 1988, *Eur J Cell Biol* **47**:165-172, expresaron α -zeínas nativas y modificadas en levadura para estudiar los determinantes de selección como diana de esta proteína. Kim *et al.*, 2002, *Plant Cell* **14**: 655-672, estudiaron las posibles interacciones de α -, β -, γ - y δ -zeína que conducen a la formación de cuerpos proteicos. Para abordar este asunto, transformaron células de levadura con ADNc que codifican estas proteínas. Además, estos autores construyeron proteínas de fusión zeína-GFP para determinar la localización subcelular de las proteínas de zeína en las células de levadura pero no observaron formación de estructuras densas, concentradas características de PB auténticos. Merece la pena indicar que Kim *et al.*, 2002, *Plant Cell* **14**: 655-672, concluyeron que la levadura no es un buen modelo para estudiar las interacciones de zeínas dado que las zeínas, por sí mismas, se acumulaban mal en levadura transformada. También se usaron las células de levadura como modelo para estudiar los mecanismos que controlan el transporte y la deposición de cuerpos proteicos de las proteínas de reserva del trigo denominadas gliadinas (Rosenberg *et al.*, 1993, *Plant Physiol* **102**:61-69).

La solicitud internacional de patente WO 2006/056483 divulga un método para formar una proteína de fusión que se expresa como un producto ensamblado de tipo cuerpo proteico recombinante en células eucariotas huéspedes y se divulgan organismos diferentes de plantas superiores como un sistema huésped. Más particularmente, se fusionan péptidos y proteínas a secuencias de proteínas que median la inducción de formación de producto ensamblado de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA), se expresan de forma estable y se acumulan en estas células huésped

después de la transformación con un vector apropiado. También se divulgan los métodos para preparar la proteína de fusión.

La actividad biológica es particularmente relevante para las vacunas, que deben inducir una respuesta inmunitaria correcta en un ser humano u otro animal inmunizado. Varias vacunas nuevas se componen de inmunógenos de subunidades sintéticas, recombinantes o altamente purificadas (antígenos) que se cree que son más seguras que las vacunas atenuadas vivas o inactivadas completas. Sin embargo, la ausencia de componentes inmunomoduladores adyuvantes con vacunas atenuadas o inactivadas a menudo produce una inmunogenicidad más débil para tales vacunas.

Los adyuvantes inmunológicos son agentes que potencian respuestas inmunitarias específicas frente a vacunas. Puede definirse un adyuvante inmunológico como cualquier sustancia o formulación que, cuando se incorpora en una vacuna, actúa generalmente para acelerar, prolongar o potenciar la calidad de respuestas inmunitarias específicas frente a antígenos de vacuna. La palabra *adyuvante* se deriva del verbo latín *adjuvare*, que significa ayudar. Los mecanismos de acción de adyuvantes incluyen los siguientes: (1) aumentar la semivida biológica o inmunológica de inmunógenos de vacuna; (2) mejorar la administración del antígeno a células presentadoras de antígeno (CPA), así como procesamiento y presentación de antígenos por las CPA; y (3) inducir la producción de citocinas inmunomoduladoras.

La fagocitosis implica la entrada de partículas grandes, tales como células apoptóticas o microbios enteros. La capacidad de las células para envolver grandes partículas apareció probablemente como función nutricional en organismos unicelulares; sin embargo los organismos complejos han aprovechado la maquinaria fagocítica para cumplir funciones adicionales. Por ejemplo, la fagocitosis de antígenos emprendida por los macrófagos, las células B o las células dendríticas representa un proceso clave en la inmunidad innata y adaptativa. De hecho, la fagocitosis y la posterior destrucción de microbios en fagosomas forman la base de la defensa innata de un organismo frente a patógenos intracelulares. Además, la degradación de patógenos en la luz del fagosoma y la producción de péptidos antigénicos, que son presentados por células fagocíticas para activar linfocitos específicos, también relacionan la fagocitosis con la inmunidad adaptativa (Jutras *et al.*, 2005 Annual Review in Cell Development Biology. 21:511–27).

Las proteínas presentes en partículas englobadas encuentran una red de proteasas degradantes en los fagosomas. Sin embargo, este entorno destructivo genera péptidos que pueden unirse a moléculas de MHC de clase II. Los complejos recién formados antígeno-MHC de clase II se administran a la superficie celular para su presentación a células T CD4+ (Boes *et al.*, 2002. Nature 418:983–988). La activación de estas células induce el subconjunto Th2 de citocinas tales como IL-4 y IL-5 que ayuda a las células B a proliferar y diferenciarse, y está asociado con respuesta inmunitaria de tipo humoral.

Un gran conjunto de pruebas indica que, además de la clara implicación de la ruta de MHC de clase II en la respuesta inmunitaria frente a patógenos fagocitados, los antígenos de patógenos, incluyendo micobacterias, *Salmonella*, *Brucella* y *Leishmania*, pueden provocar una presentación cruzada de antígenos. Es decir, la presentación de antígeno englobado mediante fagocitosis mediante la respuesta dependiente de MHC de clase I fomenta la proliferación de células T citotóxicas CD8+ (Ackerman *et al.*, 2004 Nature Immunology 5(7):678-684 Kaufmann *et al.*, 2005 Current Opinions in Immunology 17(1):79-87).

Las células dendríticas desempeñan un papel fundamental de presentación de antígenos para inducir el sistema inmunitario (Blander *et al.*, Nature Immunology 2006 10:1029-1035). Aunque poco frecuentes, las células dendríticas son las CPA más altamente especializadas, con capacidad tanto de instigar como de regular la reactividad inmunitaria (Lau *et al.* 2003 Gut 52:307-314). Aunque las células dendríticas son importantes para presentar antígenos, particularmente para iniciar respuestas inmunitarias primarias, los macrófagos son el tipo de CPA más prominente en los sitios inflamatorios y están especializados para depurar material necrótico y apoptótico. Los macrófagos no sólo pueden actuar como CPA, sino que también pueden realizar papeles o bien pro- o bien anti-inflamatorios, dependiendo de los medios mediante los que se activan.

Teniendo en cuenta que la CPA desempeña un papel fundamental en la inducción y regulación de la inmunidad adaptativa (humoral y celular), el reconocimiento y la fagocitosis del antígeno por esas células puede considerarse una etapa clave en el proceso de inmunización. Se han desarrollado una amplia variedad de técnicas basadas en la captación de partículas fluorescentes para estudiar la fagocitosis por los macrófagos (Vergne *et al.*, 1998 Analytical Biochemistry 255:127–132).

Un aspecto importante en vacunas veterinarias es la diversidad genética de la especie que está considerándose y el requisito de sistemas genéricos que funcionen en diferentes especies. En gran medida, esta diversidad limita el uso de técnicas de selección como diana molecular a marcadores de superficie celular y moduladores inmunitarios tales como citocinas, dado que para muchas especies incluyendo la fauna salvaje solo se dispone de un conocimiento mínimo de estas moléculas. Por tanto, deben preferirse los adyuvantes que se basan en señales de activación universales de la respuesta inmunitaria innata (es decir que son idénticos en especies diferentes). Teniendo en cuenta estos requisitos, los sistemas de administración de vacunas de partículas son adecuados para estrategias de vacunas veterinarias y de fauna salvaje (Scheerlinck *et al.*, 2004 Methods 40:118–124).

La publicación de Takagi *et al.*, 2005 (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 102(48): 17525-17530) describe la expresión en arroz de una proteína de fusión que comprende un poliepítipo de células T de alérgeno de polen y glicinina, que es una proteína de reserva de semilla de soja. Este documento enseña el uso de polvo de semilla aislado del arroz transgénico para inducir tolerancia para la inhibición de respuestas IgE mediadas por Th2.

Tal como se trata con mayor detalle a continuación en el presente documento, la presente invención da a conocer que la expresión de una proteína de fusión compuesta por (i) una secuencia de proteína que media la inducción de productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA) unida a (ii) un polipéptido biológicamente activo (proteína de interés o diana) induce la acumulación de esos RPBLA en células de organismos eucariotas tales como plantas, hongos, algas y animales, produciendo una diana biológicamente activa (proteína).

Breve compendio de la invención

En el presente documento se divulga un sistema y método para producir una proteína de fusión que contiene una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y un péptido o proteína biológicamente activa (a menudo denominados colectivamente en el presente documento como polipéptido o diana) de interés en células eucariotas. Las proteínas de fusión que contienen el polipéptido de interés se acumulan de manera estable como productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA) en las células eucariotas, que pueden ser células de plantas, de animales, fúngicas o de algas.

Las células de plantas superiores son células huésped eucariotas preferidas en algunas realizaciones, mientras que las células de plantas inferiores tales como algas se prefieren en otras realizaciones, las células de animales tales como mamíferos e insectos son células huésped eucariotas preferidas en realizaciones adicionales y los hongos son células huésped eucariotas preferidas en todavía otras realizaciones. La proteína de fusión puede expresarse constitutivamente o preferencialmente en células particulares en eucariotas multicelulares. Las PBIS pueden mediar la inducción de formación de RPBLA y entrada y/o acumulación de proteína de fusión en estos orgánulos, con plegamiento y/o modificaciones postraduccionales apropiadas tales como glicosilación basal y formación de enlaces disulfuro para proporcionar actividad biológica al péptido expresado o proteína de interés (dianas).

Por tanto, se divulga una célula huésped eucariota que contiene una proteína de fusión recombinante biológicamente activa dentro de productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA). La proteína de fusión contiene dos secuencias unidas entre sí en las que una secuencia es una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y la otra es la secuencia de al menos 20 residuos de aminoácidos de un polipéptido biológicamente activo. El polipéptido biológicamente activo, tal como se encuentra en la naturaleza, puede ser heterólogo con las células huésped eucariotas mencionadas y por tanto se expresa en un segundo tipo de célula que es diferente de la primera célula huésped eucariota mencionada, o se produce sintéticamente. Además, la célula huésped eucariota no produce PB en ausencia de la proteína de fusión. Por tanto, es la expresión de la proteína de fusión y la PBIS lo que provoca que la célula huésped forme productos ensamblados de tipo cuerpo proteico o RPBLA.

En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico usada para la transformación comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una PBIS, y (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un producto de interés. En una realización, el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico (i) está unido al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (ii). En otra realización, el extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico (i) está unido al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico (ii). Por tanto, la secuencia PBIS puede estar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína de fusión. Debe entenderse que todos los enlaces de ADN tratados en el presente documento para la expresión de una proteína de fusión son tales que los dos componentes de la proteína de fusión se expresan en el mismo marco de lectura.

El polipéptido biológicamente activo de la proteína de fusión muestra al menos el 25 por ciento, preferiblemente al menos el 50 por ciento, más preferiblemente el 75 por ciento, y lo más preferiblemente al menos el 90 por ciento de la actividad biológica del mismo polipéptido aislado del segundo tipo de célula en un ensayo de la actividad de ese polipéptido.

En otra realización particular, la secuencia de ácido nucleico usada para la transformación comprende, además de las secuencias de ácido nucleico (i) y (ii) mencionadas anteriormente, una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos enlazadora o espaciadora. La secuencia de aminoácidos espaciadora puede ser una secuencia de aminoácidos que puede escindirse, o que no puede escindirse, por medios enzimáticos o autoproteolíticos o químicos. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico (iii) está situada entre las secuencias de ácido nucleico (i) y (ii), por ejemplo, el extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico (iii) está unido al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (ii). En otra realización, el extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (iii) está unido al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico (ii).

Además, en una realización particular, la secuencia de ácido nucleico usada para fines de transformación codifica una secuencia según la solicitud de patente WO 2004003207, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos que puede escindirse específicamente por medios enzimáticos o químicos está presente o ausente. En una realización adicional, las proteínas de fusión pueden ser una fusión directa entre la PBIS y el péptido o proteína de interés.

En una realización adicional, el método comprende además el aislamiento y la purificación de la proteína de fusión biológicamente activa.

En otra realización, el método comprende además el aislamiento y la purificación de la proteína de fusión, y obtener una proteína de fusión biológicamente activa. Por tanto, cuando la proteína de fusión está estrechamente ensamblada y encerrada dentro de una membrana, puede ser difícil ilustrar que el polipéptido es biológicamente activo. Como consecuencia, puede ensayarse la actividad biológica tras la eliminación de la membrana y, si se requiere, la solubilización de la proteína de fusión. Se divulga un método de preparación de un polipéptido biológicamente activo.

En este método, se proporcionan productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA) que comprenden una proteína de fusión encerrada por membrana. Los RPBLA están habitualmente presentes en una forma generalmente esférica que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 micrómetros (μ), pero en algunos casos son de forma amorfa y sus dimensiones pueden variar ampliamente, pero todavía se derivan del RE. La proteína de fusión contiene dos secuencias unidas entre sí en las que una secuencia es una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y la otra es un polipéptido biológicamente activo. Los RPBLA se ponen en contacto con un tampón acuoso que contiene una cantidad de desensamblaje de membrana de un detergente (tensioactivo). Ese contacto se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para desensamblar la membrana y a una temperatura que no desnaturaliza el polipéptido biológicamente activo para separar la membrana y la proteína de fusión. Posteriormente se recoge la proteína de fusión separada de una manera habitual, o puede actuarse sobre la misma sin recogerla.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión separada muestra la actividad biológica del polipéptido biológicamente activo. En otras realizaciones, la actividad biológica del polipéptido se muestra tras disolver o dispersar la proteína de fusión en un tampón apropiado. Aún en otras realizaciones, la proteína de fusión tiene que escindirse para dar sus partes constituyentes antes de que se muestre la actividad biológica del polipéptido. Por tanto, el polipéptido biológicamente activo puede unirse a la PBIS mediante una secuencia de aminoácidos espaciadora que puede escindirse por medios enzimáticos o químicos. Después, tras la escisión, el polipéptido biológicamente activo muestra actividad biológica cuando se escinde de la PBIS de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína de fusión conserva su actividad incluso cuando todavía está incorporada en el RPBLA intacto.

En otra realización, el polipéptido biológicamente activo contiene al menos dos secuencias de glicosilación unidas a N.

Aún en otra realización preferida, el polipéptido de interés se fusiona a una proteína de reserva natural o modificada, tal como por ejemplo, prolaminas naturales o modificadas o dominios de prolamina.

Además, los RPBLA que contienen el polipéptido biológicamente activo se usan como sistema de administración para el polipéptido biológicamente activo. Los beneficios de esta invención pueden aplicarse en la administración de fármacos, vacunas y nutrición.

Por otra parte, los RPBLA que contienen un antígeno polipéptido pueden usarse como un sistema de administración para proporcionar adyuvanticidad (aumento de la respuesta inmunitaria). La administración de estos RPBLA puede representar una mejora en los parámetros de inmunización tales como la velocidad, cantidad, calidad y duración de la inmunización. El efecto beneficioso de administrar antígenos en RPBLA puede lograrse porque (i) el antígeno está encapsulado y permanece más tiempo en la sangre o en el aparato digestivo (efecto de liberación lenta) y/o (ii) el antígeno se expone mejor al sistema inmunitario (RPBLA como vehículo de presentación de antígeno) y/o (iii) la presencia de moléculas adyuvantes en las preparaciones de RPBLA y/o (iv) los RPBLA son portadores que pueden atravesar membranas que proporcionan adyuvanticidad por sí mismos y/u otros.

Por tanto, un aspecto de la invención es una vacuna o inóculo (composición inmunogénica) que comprende una cantidad inmunogénica eficaz de RPBLA que contienen proteína de fusión recombinante biológicamente activa disuelta o dispersada en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La proteína de fusión recombinante contiene dos secuencias unidas entre sí en las que una secuencia es una PBIS y la otra es un polipéptido biológicamente activo frente al cual debe inducirse una respuesta inmunológica mediante dicha vacuna o inóculo, en donde la PBIS es la de un compuesto prolamina para su uso en la generación de una respuesta inmune de células B o células T en un animal huésped contra el polipéptido inmunógeno. Normalmente la composición de diluyente farmacéuticamente aceptable también contiene agua. En otra realización un RPBLA que no incorpora un antígeno pero que posee

propiedades de adyuvante activo se administra conjuntamente con un antígeno aislado para inducir una respuesta inmunológica.

En otra realización, la PBIS puede usarse como transportador para atravesar membranas. En una realización específica la PBIS es ZERA (RX3) o un fragmento de la misma.

El método divulgado en el presente documento permite una expresión relativamente sencilla y rápida de una proteína biológicamente activa recombinante deseada en una célula eucariota de elección y proporciona una fuente de proteína biológicamente activa recombinante fácilmente obtenible y purificable debido a las propiedades únicas de la expresión en RPBLA.

Además, los RPBLA divulgados en el presente documento se pueden usar como aislantes, estructuras unidas a la membrana que aíslan el polipéptido expresado del resto de los componentes de la célula. Estos aislantes protegen la célula de la actividad del polipéptido y el polipéptido de la célula, aumentando la velocidad de acumulación. Por tanto, los polipéptidos biológicamente activos difíciles que son tóxicos y/o lábiles se pueden expresar con éxito.

La presente invención tiene varias beneficios y ventajas.

Un beneficio de la invención es que los RPBLA que contienen la proteína de fusión pueden usarse para la administración de vacunas, incluyendo vacunas de administración oral.

Otra ventaja de la presente invención es que los RPBLA que contienen la proteína de fusión pueden usarse por sí mismos como inmunógeno en una vacuna inyectable.

Todavía otros beneficios y ventajas resultarán evidentes al experto en la materia a partir de la descripción que sigue.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que forman parte de esta descripción,

La figura 1, panel A es la representación esquemática de las construcciones usadas para los estudios de transfección de células CHO. La construcción pECFP-N1 corresponde al control que expresa el ECFP en el citosol. pRX3-ECFP y pRX3-Gx5-ECFP son las construcciones que expresan la proteína de fusión RX3-ECFP, en ausencia o presencia de un espaciador formado por cinco aminoácidos glicina (Gx5), respectivamente. p22aZ-ECFP es la construcción que codifica la alfa-zeína del maíz (22 KDa) fusionada con ECFP. En la parte inferior, se representan los vectores basados en pcDNA3.1(-) (Invitrogen) junto con varias construcciones tratadas a continuación en el presente documento. El panel B muestra la representación esquemática de vectores binarios para la transformación de plantas (parte superior) y los vectores de baculovirus para la infección de insectos (parte inferior). "RX3" = secuencia de gamma-zeína rica en prolina N-terminal; "(Gly)x5" = espaciador formado por cinco glicinas; "ECFP" = gen de la proteína fluorescente cian potenciada; "P_{CMV}" = promotor de citomegalovirus humano; "P_{PH}" = promotor de polihedrina; "P_{SV40}" = promotor temprano de SV40; "CaMV35S x2" = promotor del virus del mosaico de la coliflor doble; "P_{cbh1}" = promotor de la celulasa principal; "t35S" = terminador del virus del mosaico de la coliflor; "TEV" = potenciador transcripcional del virus del grabado del tabaco; "SV40 ter" = terminador de SV40; "HSV ter" = señal de poliadenilación de timidina cinasa del virus del herpes simple; "cbh1 ter" = señal de poliadenilación de celulasa principal; "Kana/Neo" = gen de resistencia a la kanamicina/neomicina; "Amp R" = gen de resistencia a la ampicilina; "Gentamicina" = gen de resistencia a la gentamicina; "SP_{cbh1}" = péptido señal de celulasa principal; "Ori f1" = origen de ADN monocatenario f1; "Ori pUC" = origen de replicación de plásmido; "BGH ter" = terminador de hormona de crecimiento bovina; "P BLA" = promotor del gen de la beta-lactamasa; "GFP" = proteína fluorescente verde; "DsRED" = proteína fluorescente roja de dicosoma; "hGH" = hormona de crecimiento humana; "EGF" = factor de crecimiento epidérmico humano; "EK" = enterocinasa bovina; "GUS" = glucuronidasa; "RTB" = subunidad de lectina del ricino (*Ricinus communis*); "Casp2" = caspasa 2 humana; "Casp3" = caspasa 3 humana; "Int" = inteína de ADNb de Ssp de New England Biolabs; "mInt" = versión mutada de inteína de ADNb de Ssp (sustitución Asp154 → Ala).

La figura 2 muestra inmunotransferencias procedentes de estudios de fraccionamiento subcelular de células CHO transfectadas con los plásmidos pRX3-ECFP, pRX3-G-ECFP y pECFP-N1 como control (panel A); p3.1-RX3-hGH, p3.1-RX3, p3.1-RX3-EK, p3.1-RX3-C3, p3.1-RX3-C2, p3.1-RX3-GUS y p3.1-RX3-I-hGH (panel B). En el panel B, también se muestra la inmunotransferencia procedente de estudios de fraccionamiento subcelular de plantas de tabaco agroinfiltradas con pB-RX3-RTB. El panel C corresponde a estudios de fraccionamiento subcelular de larvas de insecto infectadas con pF-RX3-DsRED y pF-DsRED como control. Se cargaron homogeneizados celulares transfectados en gradientes escalonados de sacarosa, y tras centrifugación, se analizó la acumulación de las correspondientes proteínas de fusión en las fracciones de sobrenadante, interfase y sedimento, mediante inmunotransferencia. Los pesos moleculares y el anticuerpo usado en la inmunotransferencia se indican a la derecha. H, homogeneizado cargado en el gradiente de densidad; S, sobrenadante; F_x, interfase superior de la capa de sacarosa al X% p/p; P, sedimento debajo de capa de sacarosa al 56%.

La figura 3 es una fotografía de microscopía confocal en seis paneles que muestra la localización de las proteínas de fusión RX3-ECFP (panel A), RX3-Gx5-ECFP (panel B), 22aZ-ECFP (panel D), RX3-GFP (panel E) y RX3-DsRED (panel F) en los RPBLA dentro de células CHO transfectadas. Algunas de las estructuras de los RPBLA que contienen las proteínas de fusión activas (fluorescentes) se indican mediante flechas. Se muestra la localización de la ECFP en el citosol y el núcleo (panel C) en células CHO transfectadas por pECFP-N1 como control. "N" = núcleo.

La figura 4 es una fotografía de microscopía confocal en cuatro paneles que muestra la localización de proteínas de fusión de RX3 fluorescentes en diferentes huéspedes. En el panel A, se muestran secciones ópticas confocales de tejido epidérmico de la hoja de plantas de tabaco agroinfiltradas conjuntamente con pB-X3-GFP y un vector binario que codifica para HcPRO, un supresor del silenciamiento génico. Pueden observarse RPBLA muy fluorescentes que contienen la proteína de fusión RX3-GFP activa. A la derecha, en el panel B, la combinación de la fluorescencia de RX3-GFP y el contraste de fase muestra el alto porcentaje de células transfectadas de manera transitoria. La proyección de las secciones ópticas de células de insecto SF9 infectadas con pF-RX3-DsRED se muestra en el panel C. Se muestran secciones ópticas de un micrómetro de tejido graso de larvas de insecto infectadas con pF-RX3-DsRED en el panel D. Algunas de las estructuras de los RPBLA que contienen las proteínas de fusión activas (fluorescentes) se indican mediante flechas.

La figura 5 es una fotografía en seis paneles (A-F) que muestra la localización de proteínas de fusión de RX3 dentro de los RPBLA en células CHO, cuatro días después de su transfección. Se usó microscopía óptica para mostrar las células CHO que expresan RX3-hGH (paneles A y B) inmunolocalizadas usando antisuero contra RX3 y contra hGH, respectivamente. El panel C muestra la inmunolocalización de proteínas de RX3 con antisuero contra RX3. Se usó antisuero contra hGH en el panel D para inmunolocalizar la proteína de fusión RX3-I-hGH. La incubación de células CHO que expresan la proteína de fusión RX3-GUS con antisuero contra RX3 se muestra en el panel E. Se observaron RPBLA más pequeños en células CHO que expresaban RX3-EK, incubadas con antisuero contra RX3 (panel F). Se indican el retículo endoplasmático (RE) y los RPBLA.

La figura 6 muestra inmunotransferencias de tipo Western que ilustran la inducción de autoescisión de la inteína de ADNb de Ssp tras la solubilización de la proteína de fusión RX3-I-hGH a partir de una preparación de RPBLA mediante centrifugación a baja velocidad. Los paneles A y B ilustran la autoescisión de la proteína de fusión RX3-I-hGH (inteína de ADNb de Ssp de tipo natural), tras la solubilización. La proteína de fusión RX3-I_m-hGH (inteína de ADNb de Ssp mutada) se incluyó como control negativo. Se cargaron volúmenes equivalentes de las muestras por carril, y se realizó la inmunotransferencia de tipo Western con antisuero contra RX3 (panel A) o antisuero contra hGH (panel B). Las proteínas de fusión de longitud completa se indican con puntas de flecha blancas y los productos de la escisión de la inteína de ADNb de Ssp (RX3-I en el panel A, y hGH en el panel B) se indican con puntas de flecha negras. El panel C ilustra la comparación de la eficacia de autoescisión de la proteína de fusión RX3-I-hGH tras la solubilización con SDS al 0,1% (S1) y bifásica (S2). Se cargaron volúmenes equivalentes de las muestras por carril, excepto T0 que se sobrecargó 4 veces. La incubación con antisuero contra hGH muestra la proteína de fusión de longitud completa RX3-I-hGH (punta de flecha blanca) y la hGH liberada (punta de flecha negra). "S" = fracción soluble; "U" = fracción insoluble; "T0" = muestra antes de la inducción de autoescisión de la inteína.

La figura 7 contiene micrografías que muestran la captación y el procesamiento de RPBLA RX3-DsRED de larvas de insecto por macrófagos. En el panel A, se muestra un análisis de microscopía confocal de macrófagos 1 hora tras la incubación con RPBLA de RX3-DsRED de insecto. A la izquierda, pueden observarse 2 macrófagos mediante microscopía de contraste de fases. A la derecha, se muestra la imagen combinada de la fluorescencia de DsRED (puntas de flecha negras) y la autofluorescencia de los macrófagos (puntas de flecha blancas) a partir de una sección óptica de 1 micrómetro de las mismas células. La observación del núcleo (N) en esta sección óptica indica que los RPBLA han sido captados y ahora son intracelulares. El panel B muestra el estudio del transcurso de tiempo (1 y 10 horas) de la fluorescencia de DsRED emitida por los macrófagos, tras la incubación durante 1 hora con RPBLA que contienen RX3-DsRED. A la izquierda, la microscopía de contraste de fases muestra la presencia de macrófagos. A la derecha, la fluorescencia de DsRED de secciones ópticas de 1 micrómetro muestra la presencia de RPBLA sin digerir a 1 hora (punta de flecha blanca) y un patrón de fluorescencia de DsRED más homogéneo a las 10 horas indicativo de RPBLA digeridos y dispersos. La imagen del recuadro corresponde a un mayor aumento de los RPBLA sin digerir observados a 1 hora.

La figura 8 contiene micrografías que muestran la captación de RPBLA de RX3-DsRED de larvas de insecto por células dendríticas. Las fotografías corresponden a células dendríticas incubadas con RPBLA (panel A) y RPBLA sin membrana (panel B) con el tiempo (2, 5 y 10 horas). En la parte superior de cada panel, el contraste de fases muestra la presencia de células dendríticas. En la parte inferior, la fluorescencia de DsRED procedente de las mismas células dendríticas muestra la presencia de RPBLA absorbidos en la membrana plasmática (2 horas) o fagocitados dentro de la célula (5 y 10 horas). "N" = núcleo.

Descripción detallada de la invención

El polipéptido biológicamente activo recombinante divulgado es una parte de una proteína de fusión que forma productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA), frecuentemente encerrados por una membrana, en las células huésped en las que se expresan. Se induce la formación de RPBLA mediante una

secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) compuestas por un péptido señal y un dominio de proteína de reserva que forma depósitos de alta densidad dentro de las células. Estos depósitos densos pueden acumularse en el citosol, un orgánulo del sistema de endomembranas, mitocondria, plastidio o puede secretarse. Con la excepción de ciertas semillas de plantas de cereales, la célula huésped eucariota no produce por sí misma cuerpos proteicos (PB) en ausencia de la proteína de fusión. Por tanto, es la expresión de la proteína de fusión y su parte de PBIS lo que provoca que la célula huésped forme productos ensamblados de tipo cuerpo proteico o RPBLA.

La proteína de fusión divulgada comprende dos secuencias de polipéptido unidas entre sí directa o indirectamente mediante un enlace peptídico, en las que una secuencia es la de una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) unida a la segunda secuencia que es un producto polipeptídico biológicamente activo (por ejemplo, péptido o proteína) de interés (diana). El polipéptido biológicamente activo, tal como se encuentra en la naturaleza, es heterólogo a las células huésped eucariotas citadas y por tanto, se expresa en un segundo tipo de célula que es diferente de la célula huésped eucariota mencionada en primer lugar, o se produce sintéticamente. Es decir, el polipéptido biológicamente activo es heterólogo a las células huésped eucariotas citadas. Las PBIS son secuencias de aminoácidos de proteína o polipéptido que median la inducción de la formación de RPBLA y la entrada y/o acumulación de la proteína en orgánulos tales como el RE. La proteína de fusión cuando está libre y separada de las PBIS muestra una actividad biológica similar a la del polipéptido.

El polipéptido biológicamente activo de la proteína de fusión muestra al menos el 25 por ciento, preferiblemente al menos el 50 por ciento, más preferiblemente al menos el 75 por ciento y lo más preferiblemente al menos el 90 por ciento de la actividad biológica del mismo polipéptido aislado a partir del segundo tipo de célula, o sintetizado *in vitro*. Un material se considera "biólogicamente activo" o "bioactivo" si tiene interacción con o un efecto sobre algún metabolito, proteína, receptor, orgánulo, tejido en un organismo.

Estas actividades biológicas pueden determinarse y cuantificarse fácilmente usando técnicas convencionales para determinar la actividad de ese polipéptido. Por ejemplo, pueden compararse los resultados en ensayos para determinar la actividad biológica entre el polipéptido aislado a partir del segundo tipo de célula, o sintetizado *in vitro*, y el polipéptido expresado. Cuando se compara la actividad de una proteína de fusión, se tiene en cuenta la proporción de ese material proporcionado por la PBIS y cualquier secuencia enlazadora en la comparación del ensayo. La actividad biológica puede mostrarse por los RPBLA expresados, la proteína de fusión como una proteína libre de una membrana circundante o como un polipéptido diana que está libre de su PBIS.

La secuencia de ácido nucleico usada para la transformación comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una PBIS, y (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un producto de interés. El extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico (i) se une al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (ii). Por otra parte, el extremo 5' de secuencia de ácido nucleico (i) se une al extremo 3' de secuencia de ácido nucleico (ii). Por tanto, la secuencia PBIS puede estar en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la proteína de fusión. Ha de entenderse que todas las uniones de ADN tratadas en el presente documento para la expresión de una proteína de fusión son tales que los dos componentes de la proteína de fusión se expresan en el mismo marco de lectura.

La mayor parte de los cuerpos proteicos tiene estructuras con forma redonda (generalmente esférica), con diámetros de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 μ . Cuando se expresan en células animales, los RPBLA son generalmente de forma esférica, tienen diámetros de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 micrómetros (μ) y tienen una membrana circundante. Los RPBLA expresados en plantas normalmente también son generalmente esféricos, tienen diámetros de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 μ , y están rodeados por una membrana. Los RPBLA expresados o bien en plantas, animales o bien en hongos se derivan del RE si se dirigen allí mediante una señal de secreción específica del RE y se acumulan de manera externa a la envuelta del RE de la célula huésped tras el ensamblaje. Se observa que los RPBLA que contienen EGF expresados en el RE de células vegetales no eran generalmente esféricos y eran de forma amorfa y de tamaño no uniforme.

Los productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante tienen una densidad predeterminada que pueden diferir entre diferentes proteínas de fusión, pero se conoce para una proteína de fusión particular que se prepara. Esa densidad predeterminada de los RPBLA normalmente es superior a sustancialmente todas las proteínas endógenas de la célula huésped presentes en el homogeneizado, y normalmente es de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,35 g/ml. La alta densidad de los RPBLA novedosos se debe a la capacidad general de las proteínas de fusión recombinantes para ensamblarse como multimeros y acumularse en agregados ordenados asociados con las membranas. Los RPBLA divulgados se expresan en eucariotas y pueden caracterizarse mediante sus densidades tal como se indicó anteriormente, y su tamaño y su forma.

Se cree que la parte de polipéptido de la proteína de fusión obtiene su actividad biológica a partir del plegamiento dentro del RE y en algunos casos a partir de la glicosilación en el RE. De manera interesante, la mayor parte de las plantas, animales tales como mamíferos y eucariotas de una sola célula tales como los hongos, N-glicosilan proteínas en el mismo patrón basado en la secuencia de glicosilación tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en las que "X" es cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. Por tanto, se forma inicialmente un polipéptido con enlaces a N Glc₃Man₉(GlcNAc)₂, y se corta de nuevo tras la formación para dar un polipéptido con enlaces a N Man₇.

9(GlcNAc)₂ que puede excretarse al aparato de Golgi o retenerse dentro del RE. Esta glicosilación basal es notablemente similar a través de los géneros de eucariotas. Una modificación postraducciona adicional tal como glicosilación terminal específica del huésped puede producirse en el aparato de Golgi para proteínas no mantenidas en los RPBLA como lo son las proteínas de fusión contempladas en el presente documento.

En este método, se proporcionan productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA) que frecuentemente comprenden un producto ensamblado ordenado de proteína de fusión encerrada por membrana, están presentes preferiblemente en una forma generalmente esférica que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 micrómetros. La proteína de fusión contiene dos secuencias unidas entre sí en las que una secuencia es una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y la otra es un polipéptido biológicamente activo. Los RPBLA se ponen en contacto con un tampón acuoso que contiene una cantidad de desensamblaje de membrana de un detergente (tensioactivo). Ese contacto se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para desensamblar la membrana y a una temperatura que no desnaturalice el polipéptido biológicamente activo (por ejemplo, de superior a la congelación a aproximadamente 40°C) para separar la membrana y la proteína de fusión. La proteína de fusión separada se recoge posteriormente de manera habitual, o puede hacerse actuar adicionalmente sin su recogida. Los tensioactivos útiles ilustrativos incluyen Triton-X 100, CHAPS y similares tal como se conocen en bioquímica para solubilizar lípidos.

La proteína de fusión separada está normalmente en una forma insoluble debido a las interacciones entre las partes de PBIS de la proteína de fusión mediada al menos en parte por la presencia de residuos de cisteína. Sin embargo, el polipéptido de interés está en complejo con chaperonas y foldasas eucariotas derivadas del RE y así se mantiene en una conformación plegada correctamente a pesar de estar sujeto al dominio PBIS ensamblado (y por tanto, insoluble). Las interacciones PBIS-PBIS pueden perturbarse y la proteína de fusión solubilizarse poniendo en contacto la proteína de fusión con un tampón acuoso que contiene un agente reductor tal como ditiotreitól o 2-mercaptoetanol o β-mercaptoetanol (β-ME). Se eligen las condiciones de modo que no se perturbe ni se despliegue la proteína biológicamente activa unida de interés. La proteína de fusión solubilizada, separada que contiene el polipéptido biológicamente activo entonces se recoge o se usa de otro modo. Además, las dos partes de la fusión pueden escindirse la una de la otra con solubilización. Ha de entenderse que no es necesario que la escisión sea en los límites exactos entre las dos partes.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión separada muestra la actividad biológica del polipéptido biológicamente activo. En otras realizaciones, la proteína de fusión se disuelve o se dispersa en un tampón adecuado para que se muestre la actividad biológica del polipéptido. Por ejemplo, tal como se trata en detalle más adelante en el presente documento, la hormona de crecimiento humana (hGH) expresada en RPBLA en células de mamífero y solubilizada como una proteína de fusión mostró actividad significativa y también como un péptido escindido mostró actividades sustancialmente similares a las del polipéptido nativo.

Aún en otras realizaciones, para la proteína de fusión tiene que escindirse en sus partes constituyentes antes de que se muestre la actividad biológica del polipéptido. Por tanto, el polipéptido biológicamente activo puede unirse a la PBIS mediante una secuencia de aminoácidos espaciadora que puede escindirse por medios enzimáticos o químicos. Entonces, con la escisión de la PBIS de la proteína de fusión y ensayo, el polipéptido diana (biológicamente activo) muestra actividad biológica. Los estudios tratados a continuación en el presente documento ilustran la actividad biológica del polipéptido T-20 escindido de su pareja de fusión y producido en plantas.

Secuencias inductoras de cuerpos proteicos

En el presente documento se divulga una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y una célula huésped que son preferiblemente de diferentes filos biológicos. Por tanto, la PBIS es preferiblemente de una planta superior, una espermatofita, mientras que la célula huésped es una eucariota que es distinta a una espermatofita y puede ser una célula animal, como por ejemplo células de mamífero o insecto, un hongo, o una célula de alga, todas las cuales son de diferentes filos al de las espermatofitas. Una PBIS y la célula huésped también pueden ser del mismo filo de modo que ambos pueden ser de una planta superior, por ejemplo. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes de PBIS incluyen proteínas de reserva o proteínas de reserva modificadas, como por ejemplo, prolaminas o prolaminas modificadas, dominios de prolamina o dominios de prolamina modificados. Se revisan las prolaminas en Shewry *et al.*, 2002 J. Exp. Bot. 53(370):947-958. PBIS preferidas son las de compuestos de prolamina tales como gamma-zeína, alfa-zeína, delta-zeína, beta-zeína, prolamina de arroz y la gamma-gliadina que se tratan más adelante en el presente documento.

Una PBIS también incluye una secuencia que dirige una proteína hacia el retículo endoplasmático (RE) de una célula vegetal. Esa secuencia a menudo denominada secuencia líder o péptido señal puede ser de la misma planta que el resto de la PBIS o de una planta diferente o un animal o un hongo. Péptidos señal ilustrativos son la secuencia de péptido señal de la gamma-zeína de 19 residuos mostrada en el documento WO 2004003207 (documento US 20040005660), la secuencia de péptido señal de 19 residuos de la alfa-gliadina o la secuencia de péptido señal de la gamma-gliadina de 21 residuos (véase, Altschuler *et al.*, 1993 Plant Cell 5:443-450; Sugiyama *et al.*, 1986 Plant Sci. 44:205-209; y Rafalski *et al.*, 1984 EMBO J 3(6):1409-11415 y las citas en ellas). La proteína relacionada con la patogénesis de la clase PR10 incluye una secuencia de péptido señal de 25 residuos que

también es útil en el presente documento. También se describen en la bibliografía otros péptidos señal de funcionamiento similar de otras plantas y animales.

Las características de los péptidos señal responsables de dirigir la proteína al RE se han estudiado extensamente (von Heijne *et al.*, 2001 Biochim. Biophys. Acta Dic 12 1541(1-2):114-119). Los péptidos señal no comparten homología en la estructura primaria, pero tienen una estructura tripartita común: una región h hidrofóbica central y regiones flanqueantes N y C-terminales hidrófilas. Estas similitudes, y el hecho de que las proteínas se translocan a través de la membrana del RE usando rutas aparentemente comunes, permite el intercambio de los péptidos señal entre diferentes proteínas o incluso de diferentes organismos pertenecientes a diferentes filos (véanse, los ejemplos 1 y 2 más adelante en el presente documento, y Martoglio *et al.*, 1998 Trends Cell Biol. Oct; 8(10):410-415). Por tanto, una PBIS puede incluir un péptido señal de una proteína de un filo diferente al de las plantas superiores.

La gamma-zeína, una proteína de reserva del maíz cuyas secuencias de ADN y residuos de aminoácidos se muestran más adelante en el presente documento, es una de las cuatro prolaminas del maíz y representa el 10-15 por ciento de la proteína total en el endospermo del maíz. Como otras prolaminas de cereales, las alfa y gamma-zeínas se biosintetizan en polisomas unidos a membrana en el lado citoplasmático del RE rugoso, se ensamblan dentro de la luz y entonces se secuestran en corpúsculos de proteína derivados del RE (Herman *et al.*, 1999 Plant Cell 11:601-613; Ludevid *et al.*, 1984 Plant Mol. Biol. 3:277-234; Torrent *et al.*, 1986 Plant Mol. Biol. 7:93-403).

La gamma-zeína se compone de cuatro dominios característicos i) una señal peptídica de 19 aminoácidos, ii) el dominio de repetición que contiene ocho unidades del hexapéptido PPPVHL (SEQ ID NO:1) [(53 residuos de aminoácido (aa)], iii) el dominio ProX en el que se alternan residuos de prolina con otros aminoácidos (29 aa) y iv) el dominio C-terminal hidrófobo rico en cisteína (III aa).

La capacidad de la gamma-zeína para ensamblarse en RPBLA derivados del RE no se limita a semillas. De hecho, cuando se expresó constitutivamente el gen de la gamma-zeína en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, la proteína de reserva se acumulaba dentro de PBLs derivados del RE en células del mesófilo de la hoja (Geli *et al.*, 1994 Plant Cell 6:1911-1922). Buscando una señal responsable de la deposición de gamma-zeína en los cuerpos proteicos derivados del RE (las prolaminas no tienen la señal KDEL), se ha demostrado que el dominio N-terminal rico en prolina que incluye el dominio de repetición en tándem era necesario para la retención en el RE. En este trabajo, también se sugirió que el dominio C-terminal podría estar implicado en la formación de cuerpos proteicos, sin embargo, datos recientes (documento WO2004003207A1) demuestran que el dominio N-terminal rico en prolina es necesario y suficiente para la retención en el RE y para inducir la formación de corpúsculos de proteína. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estos dominios promueven el producto ensamblado de corpúsculos de proteína todavía se desconocen, pero la evidencia a partir de estudios *in vitro* sugiere que la parte N-terminal de la gamma-zeína puede autoensamblarse en estructuras ordenadas.

Se prefiere que una PBIS basada en gamma-zeína incluya al menos una repetición y los nueve residuos amino-terminales del dominio ProX, y más preferiblemente el dominio Pro-X entero. La parte C-terminal de la gamma-zeína no es necesaria, pero puede estar presente. Esas secuencias se muestran en el documento US 20040005660 y se designan como RX3 y P4, respectivamente, y se indican más adelante en el presente documento.

Puesto que los cuerpos proteicos se denominan así apropiadamente sólo en semillas, las estructuras similares producidas en otros órganos de plantas y en plantas que no son superiores se denominan generalmente como PB sintéticos o productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA).

Las zeínas son de cuatro tipos distintos: alfa, beta, delta y gamma. Se acumulan de manera secuencial en los cuerpos proteicos derivados del RE durante el desarrollo del endospermo. La beta-zeína y la delta-zeína no se acumulan en gran cantidad en PB de maíz, sino que son estables en los tejidos vegetativos y se depositaron en las estructuras de tipo cuerpo proteico derivadas del RE cuando se expresaron en plantas de tabaco (Bagga *et al.*, 1997 Plant Cell Sep 9(9):1683-1696). Este resultado indica que la beta-zeína, así como la delta-zeína, pueden inducir retención en el RE y formación de cuerpos proteicos.

Las proteínas de reserva de prolamina de trigo, gliadinas, son un grupo de proteínas sin K/HDEL cuyo transporte a través del RE parece ser complejo. Estas proteínas se secuestran en el RE en el que o bien se retienen o bien se empaquetan en cuerpos proteicos densos, o se transportan desde el RE a través del aparato de Golgi hacia las vacuolas. (Altschuler *et al.*, 1993 Plant Cell 5:443-450.)

Las gliadinas parecen ser quimeras naturales, que contienen dos regiones autónomas plegadas por separado. El extremo N-terminal se compone de aproximadamente 7 a aproximadamente 16 repeticiones en tándem ricas en glutamina y prolina. La secuencia de las repeticiones en tándem varía entre las diferentes gliadinas, pero se basan en una u otra de las secuencias de consenso PQQPFPQ (SEQ ID NO:47), PQQQPPFS (SEQ ID NO:48) y PQQPQ (SEQ ID NO:49). La región C-terminal de la proteína contiene de seis a ocho cisteínas que forman enlaces disulfuro intramoleculares. El trabajo del grupo de Altschuler *et al.* indica que la región N-terminal y las secuencias consenso son responsables de la formación de PB en el RE a partir de gamma-gliadina. (Altschuler *et al.*, 1993 Plant Cell 5:443-450.)

Se muestran otras secuencias de tipo prolamina útiles ilustrativas en la siguiente tabla junto con sus identificadores en GenBank.

NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ID DE GENBANK
α -Zeína (22 kD)	M86591
Albúmina (32 kD)	X70153
γ -Zeína (27 kD)	X53514
γ -Zeína (50 kD)	AF371263
δ -Zeína (18 kD)	AF371265
Globulina 7S o tipo vicilina	NM_113163
Globulina 11S o tipo legumina	DQ256294
Prolamina 13 kD	AB016504
Prolamina 16 kD	AY427574
Prolamina 10 kD	AF294580
γ -Gliadina	M36999
Precursor de γ -Gliadina	AAA34272

Se obtienen otras secuencias útiles llevando a cabo una búsqueda BLAST en todas las bases de datos no redundantes de GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF (excluyendo las muestras ambientales) tal como se describe en Altschul *et al.*, 1997 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 usando una consulta tal como las mostradas a continuación:

Búsqueda de RX3 (SEQ ID NO: 2)
 Alfa-zeína (SEQ ID NO: 3)
 Búsqueda de prolamina de arroz (SEQ ID NO: 4)

Una prolamina modificada ilustrativa incluye (a) una secuencia de péptido señal, (b) una secuencia de una o más copias del hexapéptido del dominio de repetición PPPVHL (SEQ ID NO: 1) de la proteína gamma-zeína, conteniendo el dominio entero ocho unidades de hexapéptido; y (c) una secuencia de todo o parte del dominio ProX de gamma-zeína. Las prolaminas modificadas específicas ilustrativas incluyen los polipéptidos identificados a continuación como R3, RX3 y P4 cuyas secuencias de ADN y residuos de aminoácidos también se muestran a continuación.

Las prolaminas particularmente preferidas incluyen la gamma-zeína y sus partes componentes tal como se da a conocer en la solicitud publicada WO2004003207, la proteína rP13 del arroz y la alfa-zeína del maíz de 22 kDa y su fragmento N-terminal. Las secuencias de ADN y residuos de aminoácidos de las proteínas gamma-zeína, del arroz y alfa-zeína se muestran a continuación.

Gamma-zeína de 27 kD
 Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 5)
 Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 6)

RX3
 Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 7)
 Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 8)

R3
 Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 9)
 Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 10)

P4
 Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 11)
 Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 12)

X10
 Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 13)
 Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 14)

rP13 – prolamina de arroz de 13 kD homóloga al clon - AB016504 Sha *et al.*, 1996 Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(2):335-337; Wen *et al.*, 1993 Plant Physiol. 101(3):1115-1116; Kawagoe *et al.*, 2005 Plant Cell 17(4):1141-1153; Mullins *et al.*, 2004 J. Agric. Food Chem. 52(8):2242-2246; Mitsukawa *et al.*, 1999 Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(11):1851-1858

Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 15)

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 16)

22aZt fragmento N-terminal de la alfa-zeína del maíz de 22 kD - V01475 Kim *et al.*, 2002 Plant Cell 14(3):655-672; Woo *et al.*, 2001 Plant Cell 13(10):2297-2317; Matsushima *et al.*, 1997 Biochim. Biophys. Acta 1339(1):14-22; Thompson *et al.*, 1992 Plant Mol. Biol. 18(4):827-833.

Secuencia de proteína (longitud completa) (SEQ ID NO: 17)

Secuencia de ADN (longitud completa) (SEQ ID NO: 18)

Precursor de gamma-gliadina - AAA34272- Scheets *et al.*, 1988 Plant Sci. 57:141-150.

Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 19)

Secuencia de ADN (M36999) (SEQ ID NO:20)

Beta zeína - AF371264 – Woo *et al.*, (2001) Plant Cell 13 (10), 2297-2317.

ADN (SEQ ID NO: 21)

Proteína (SEQ ID NO: 22)

Delta-zeína 10 kD - AF371266 – Woo *et al.*, (2001) Plant Cell 13 (10), 2297-2317. y Kirihaara *et al.*, (1988) Gene. Nov 30; 71(2):359-70.

ADN (SEQ ID NO:23)

Proteína (SEQ ID NO:24)

Péptidos señal

Gamma-Zeína (SEQ ID NO:25)

Alfa-Gliadina (SEQ ID NO:26)

Gamma-Gliadina (SEQ ID NO:27)

PR10 (SEQ ID NO:28)

Proteínas de interés

Los ejemplos de polipéptidos o proteínas de interés (dianas) incluyen cualquier proteína que tenga usos terapéuticos, nutracéuticos, agrícolas, de biocontrol o industriales. Las actividades ilustrativas de tales proteínas incluyen (a) captura y emisión de luz tal como proporciona la proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian potenciada (ECFP), proteína fluorescente roja (DsRED) y similares; (b) actividad enzimática tal como puede estar asociada con la señalización intracelular primaria y secundaria y las rutas metabólicas, se ejemplariza por enterocinasa, beta-glucuronidasa (GUS), fitasa, anhidrasa carbónica, y enzimas industriales (hidrolasas, glicosidasas, celulasas, oxido-reductasas, y similares); (c) interacción proteína-proteína, proteína-receptor y proteína-ligando tal como, por ejemplo anticuerpos (Acm tales como IgG, IgM, IgA, etc.) y fragmentos de los mismos, hormonas [calcitonina, hormona de crecimiento humana (hGH), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y similares], inhibidores de proteasas, antibióticos, antimicrobianos, inhibidores de la entrada del VIH [Ryser *et al.*, 2005 Drug Discov Today. Ago. 15; 10(16):1085-1094], colágeno, lactoferrina humana y citocinas; (d) antígenos proteicos y peptídicos para vacunas (virus de la inmunodeficiencia humana, VIH; antígenos de presuperficie, superficie y núcleo de la hepatitis B, gen P1 de la poliproteína estructural del virus de la fiebre aftosa (VFA) [Dus Santos *et al.*, 2005 Vaccine. Mar 7; 23(15):1838-1843] péptidos estimuladores de células T de la patente estadounidense número 4.882.145, coronavirus de la gastroenteritis, virus del papiloma humano, y similares); (e) interacciones proteína-no proteína tales como, fitohemagglutrina (PHA), la subunidad B de la toxina ricina (RTB) y otras lectinas.

Se conocen bien en la técnica ensayos para determinar la bioactividad de tales polipéptidos expresados y están disponibles en una o más publicaciones. Por ejemplo, la actividad de la ECFP (proteína fluorescente cian potenciada) puede medirse cuantificando la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 470-530 nm cuando la proteína se ha excitado a 458 nm. Véase, Richards *et al.*, 2003 Plant Cell Rep. 22:117-121. La actividad enzimática de enterocinasa (EK), por ejemplo, puede medirse con dos enfoques diferentes. La actividad puede determinarse analizando la escisión de una proteína de fusión que contiene el sitio de escisión específico de enterocinasa mediante inmunotransferencia de tipo Western, tal como se trata en el catálogo de Invitrogen Life Technologies (E180-01 y E180-2), y también cuantificando la actividad EK usando un sustrato peptídico fluorogénico para EK (Sigma G-5261, CAS[®] RN 70023-02-8); la actividad enzimática se mide mediante un aumento de fluorescencia (excitación a 337 nm, emisión a 420 nm) producido por la liberación de β -naftilamina desde el péptido con el tiempo. Véase, LaVallie *et al.*, 1993 J. Biol. Chem. 268(31):23311-23317. La actividad de la enzima beta-glucuronidasa (GUS) puede medirse mediante la conversión del sustrato MUG (4-metil-umbeliferil-glucuronido) en el producto MU. Este producto puede cuantificarse midiendo la fluorescencia con excitación a 365 nm, emisión a 455 nm en un espectrofluorímetro. Véase, Pai-Hsiang *et al.*, 2001 J. Plant Physiol. 158(2):247-254; y Jefferson *et al.*, 1987 EMBO J 6:3901-3907. Los ensayos de fitasa se llevan a cabo mediante la cuantificación de orto-fosfatos inorgánicos

liberados a partir del reactivo AAM que consiste en acetona, ácido sulfúrico 5,0 N y molibdato de amonio 10 mM. Véase, Ullah *et al.*, 1999 Biochem. Biophys. Res. Commun. 264(1):201-206. Se dispone de ensayos similares para otras proteínas biológicas. Pueden realizarse los ensayos de actividad de RTB midiendo la unión de RTB a asialofetuína, lactosa y galactosa, tal como se describe en Reed *et al.*, 2005 Plant Cell Rep. Abr; 24(1):15-24.

El EGF es un factor de crecimiento implicado en la proliferación de fibroblastos. La actividad de EGF puede ensayarse mediante la cuantificación de la inducción de síntesis de ADN medida mediante la incorporación del análogo de pirimidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), en lugar de timidina, en el ADN de células en proliferación el ensayo ELISA de proliferación celular [Oliver, *et al.*, 2004 Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:1118-1129; nº de catálogo 1647229, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania]

Se observa que la captura y emisión de luz constituye un tipo especial y separado de "actividad biológica" en el que tal actividad no proporciona un uso terapéutico, nutracéutico, agrícola, de biocontrol o industrial como lo hacen los otros tipos de actividad indicados anteriormente. Los polipéptidos de esta clase de dianas se incluyen en el presente documento como biológicamente activos porque comparten algunas de las características estructurales secundarias, terciarias y cuaternarias requeridas que tienen las moléculas diana que proporcionan usos terapéuticos, nutracéuticos, agrícolas, de biocontrol o industriales. Estas proteínas son útiles, sin embargo, como moléculas indicadoras en muchos tipos de ensayos o selecciones usados en el análisis o el descubrimiento de moléculas biológicamente importantes, y su actividad luminiscente requiere la presencia de una estructura secundaria y terciaria de la proteína correcta. Posiblemente es más preciso referirse al grupo de dianas como aquellos polipéptidos que son biológicamente activos y/o luminiscentemente activos.

Se proporcionan a continuación secuencias ilustrativas de ADN y residuos de aminoácidos para proteínas de interés ilustrativas.

ECFP
ADN (SEQ ID NO:29)
proteína (SEQ ID NO:30)

GUS1381
ADN (SEQ ID NO:31)
proteína (SEQ ID NO:32)

GUS1391Z
ADN (SEQ ID NO:33)
proteína (SEQ ID NO:34)

Calcitonina de salmón BAC57417
Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 35)
Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 36)

hEGF – Construcción basada en AAF85790 sin el péptido señal
Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 37)
Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 38)

hGH – Construcción basada en P01241 sin el péptido señal
Secuencia de proteína (SEQ ID NO: 39)
Secuencia de ADN (SEQ ID NO:40)

La proteína de fusión recombinante comprende adicionalmente, además de las secuencias de la PBIS y el producto de interés, una secuencia de aminoácidos espaciadora. La secuencia de aminoácidos espaciadora puede ser una secuencia de aminoácidos escindible por medios químicos o enzimáticos o no escindible. Por "no escindible" se pretende decir que la escisión del espaciador no se produce sin la destrucción de parte o todo el polipéptido biológicamente activo.

Además, la secuencia de aminoácidos espaciadora está situada entre la PBIS y el polipéptido biológicamente activo. Una secuencia de aminoácidos ilustrativa es escindible por una proteasa tal como una enterocinasa, Arg--C endoproteasa, Glu--C endoproteasa, Lys--C endoproteasa, Factor Xa, proteasas de SUMO [Tauseef *et al.*, 2005 Protein Expr. Purif. 2005 Sep 43(1):1-9] y similares. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos espaciadora corresponde a una secuencia autoescindible tal como la secuencia 2A de autoproteólisis viral del VFA, inteínas tales como la inteína de ADN de Ssp y similares tal como están disponibles comercialmente de New England Biolabs y otros. El uso de una secuencia enlazadora de inteína se prefiere ya que tales secuencias pueden inducirse selectivamente para provocar el corte y empalme de la proteína y eliminarse así ellas mismas de una proteína expresada, recuperada. Las inteínas son particularmente interesantes porque no requieren grandes proteínas enzimáticas para alcanzar su sitio diana con el fin de escindir la PBIS de la proteína de interés. Esta propiedad puede ser particularmente útil para el aislamiento directo de proteínas de interés a partir de RPBLA intactos.

Alternativamente, está codificada una secuencia de aminoácidos que es específicamente escindible por un reactivo químico, tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que escinde en los residuos de metionina.

Además, la secuencia de aminoácidos espaciadora está situada entre la PBIS y el polipéptido biológicamente activo. Una secuencia de aminoácidos ilustrativa es escindible por una proteasa tal como una enterocinasa, Arg--C endoproteasa, Glu--C endoproteasa, Lys--C endoproteasa, Factor Xa, proteasas de SUMO [Tauseef *et al.*, 2005 Protein Expr. Purif. 2005 Sep 43(1):1-9] y similares. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos espaciadora corresponde a una secuencia autoescindible tal como la secuencia 2A de autoproteólisis viral del VFA, inteínas tales como la inteína de ADN_b de Ssp y similares tal como están disponibles comercialmente de New England Biolabs y otros. El uso de una secuencia enlazadora de inteína se prefiere ya que tales secuencias pueden inducirse selectivamente para provocar el corte y empalme de la proteína y eliminarse así ellas mismas de una proteína expresada, recuperada. Las inteínas son particularmente interesantes porque no requieren grandes proteínas enzimáticas para alcanzar su sitio diana con el fin de escindir la PBIS de la proteína de interés. Esta propiedad puede ser particularmente útil para el aislamiento directo de proteínas de interés a partir de RPBLA intactos. Alternativamente, está codificada una secuencia de aminoácidos que es específicamente escindible por un reactivo químico, tal como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que escinde en los residuos de metionina.

La secuencia de ácido nucleico usada para fines de transformación es tal como se da a conocer según la solicitud de patente cedida junto con la presente WO 2004003207, con o sin la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos escindible.

Métodos de preparación

Las proteínas de fusión se preparan según un método que comprende transformar un sistema de célula huésped eucariota tal como un animal, cultivo de células animales, planta o cultivo de células vegetales, cultivo de hongos, cultivo de células de insecto o cultivo de algas con una secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que comprende (i) un primer ácido nucleico que codifica una PBIS que está operativamente unida en el mismo marco de lectura a (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un producto de interés de polipéptido que es biológicamente activo; es decir, la secuencia de ácido nucleico que codifica la PBIS está químicamente unida (con enlaces peptídicos) a la secuencia que codifica el polipéptido de interés de tal manera que ambos polipéptidos se expresan desde sus marcos de lectura apropiados y la proteína de interés es biológicamente activa. También se divulga que estén presentes secuencias reguladoras apropiadas en cualquier lado de las secuencias de ácido nucleico que codifican la PBIS y la proteína de interés tal como se trata más adelante en el presente documento. Tales secuencias de control se conocen bien y están presentes en vectores disponibles comercialmente. El uso de medios indirectos de introducción de ADN, tal como a través de transducción o infección viral, también se divulga, y se usará de manera intercambiable con métodos directos de inserción de ADN tales como transfección.

La célula huésped o entidad transformada se mantiene durante un periodo de tiempo y en condiciones de cultivo adecuadas para la expresión de la proteína de fusión y el ensamblaje de la proteína de fusión expresada en productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA). Con la expresión, la proteína de fusión resultante se acumula en el sistema de huésped transformado como productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante de alta densidad. La proteína de fusión puede recuperarse entonces a partir de las células huésped o pueden usarse las células huésped que contienen la proteína de fusión según se desee, como para un alimento para animales que contiene un nutriente o aporte complementario añadido. La proteína de fusión puede aislarse como parte de los RPBLA o libre de los RPBLA.

Las condiciones de cultivo adecuadas para la expresión de la proteína de fusión normalmente son diferentes para cada tipo de entidad huésped o célula huésped. Sin embargo, los trabajadores expertos conocen esas condiciones y las determinan fácilmente. De manera similar, la duración del mantenimiento puede diferir con las células huésped y con la cantidad de proteína de fusión que se desee preparar. De nuevo, se conocen bien esas condiciones y pueden determinarse fácilmente en situaciones específicas. Adicionalmente, pueden obtenerse condiciones de cultivo específicas a partir de las citas del presente documento.

En la proteína de fusión, el extremo 3' de la primera secuencia de ácido nucleico (i) se une (enlaza) al extremo 5' de la segunda secuencia de ácido nucleico (ii). De forma alternativa, el extremo 5' de la primera secuencia de ácido nucleico (i) se une (enlaza) al extremo 3' de la segunda secuencia de ácido nucleico (ii). La PBIS comprende una proteína de reserva o una proteína de reserva modificada, un fragmento o un fragmento modificado de las mismas.

Además, se divulga una proteína de fusión que se prepara según un método que comprende transformar el sistema de célula huésped tal como un animal, cultivo de células animales, planta, cultivo de células vegetales, hongo o alga con una secuencia de ácido nucleico que comprende, además de las secuencias de ácido nucleico (i) y (ii) mencionadas previamente, una secuencia de ácido nucleico en el mismo marco de lectura (iii) que codifica una secuencia de aminoácidos espaciadora. La secuencia de aminoácidos espaciadora puede ser una secuencia de aminoácidos escindible por medios enzimáticos o químicos, o no escindible, tal como se indicó anteriormente. La secuencia de ácido nucleico (iii) está situada entre dichas secuencias de ácido nucleico (i) y (ii), por ejemplo, el

extremo 3' de la tercera secuencia de ácido nucleico (iii) se une al extremo 5' de la segunda secuencia de ácido nucleico (ii). De forma alternativa, el extremo 5' de la tercera secuencia de ácido nucleico (iii) se une al extremo 3' de la segunda secuencia de ácido nucleico (ii).

- 5 Una secuencia de ácido nucleico (segmento) que codifica una molécula de proteína de fusión descrita previamente o un complemento de esa secuencia codificante también se contempla en el presente documento. Tal segmento de ácido nucleico está presente en forma aislada y purificada.

10 En organismos vivos, la secuencia de residuos de aminoácidos de una proteína o polipéptido está relacionada directamente a través del código genético con la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) del gen que codifica la proteína. Por tanto, a través de la bien conocida degeneración del código genético pueden prepararse secuencias de ADN adicionales y las correspondientes de ARN (ácidos nucleicos) según se desee, que codifican las secuencias de residuos de aminoácidos de la misma proteína de fusión, pero que son suficientemente diferentes de una secuencia génica tratada anteriormente en que las dos secuencias no hibridan con alta rigurosidad, sino que
15 hibridan con rigurosidad moderada.

Las condiciones de alta rigurosidad pueden definirse como que comprenden hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55°C en 6XSSC y un lavado final a una temperatura de 68°C en 1-3XSSC. Las condiciones de rigurosidad moderada comprenden hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente
20 65°C en NaCl de 0,2 a 0,3 M, seguido por lavado a aproximadamente de 50°C a aproximadamente 55°C en 0,2X SSC, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 0,1%.

Una secuencia de ácido nucleico (una secuencia de ADN o una secuencia de ARN) que (1) codifica ella misma, o su complemento codifica, una proteína de fusión que contiene una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y un polipéptido de interés también se contempla en el presente documento. Tal como se conoce bien, una secuencia de ácido nucleico tal como una secuencia de ácido nucleico contemplada se expresa cuando está operativamente unida a un promotor apropiado en un sistema de expresión apropiado tal como se trata en otra parte en el presente documento. Esta secuencia de ácido nucleico puede insertarse directa o indirectamente (a través de un microorganismo vector apropiado tal como un virus o una bacteria) en la célula huésped eucariota, y puede
25 integrarse de manera estable en el genoma organular o nuclear, o expresarse de manera transitoria sin integración en el genoma.

A menudo diferentes huéspedes tienen preferencias para que se use un codón particular para codificar un residuo de aminoácido particular. Tales preferencias de codones se conocen bien y puede alterarse una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de proteína de fusión deseada, usando mutagénesis *in vitro* por ejemplo, de modo que se utilizan los codones preferidos por el huésped para un huésped particular en el que va a expresarse la proteína de fusión.
35

Una molécula de ácido nucleico recombinante tal como una molécula de ADN, que comprende un vector que contiene una o más secuencias reguladoras (elementos de control) tales como un promotor adecuado para dirigir la expresión del gen en un organismo de célula huésped eucariota compatible operativamente unido a un segmento de ácido nucleico exógeno (por ejemplo, una secuencia o segmento de ADN) que define un gen que codifica la proteína de fusión divulgada, tal como se trató anteriormente, también se divulga. Más particularmente, también se divulga una molécula de ADN recombinante que comprende un vector que comprende un promotor para dirigir la expresión de la proteína de fusión en células del organismo huésped operativamente unidas a un segmento de ADN que define un gen codifica una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) unida a un polipéptido de interés. Esa molécula de ADN recombinante, con la transfección y expresión adecuadas en una célula huésped eucariota, proporciona una proteína de fusión como los RPBLA.
40 45

Tal como se conoce bien en la técnica, siempre que el ácido nucleico requerido, de manera ilustrativa la secuencia de ADN, esté presente (incluyendo señales de iniciación y de terminación), normalmente pueden estar presentes pares de bases adicionales en cualquier extremo del segmento de ADN y ese segmento puede utilizarse todavía para expresar la proteína. Naturalmente, esto supone la ausencia en el segmento de una secuencia de ADN operativamente unida que reprime la expresión, expresa otro producto que consume la proteína de fusión que se desea que se exprese, expresa un producto que consume un producto de reacción deseado producido por esa proteína de fusión deseada, o interfiere de otro modo con la expresión del gen del segmento de ADN.
50 55

Por tanto, siempre que el segmento de ADN esté libre de tales secuencias de ADN interferentes, un segmento de ADN de la invención puede tener de aproximadamente de 500 a aproximadamente 15.000 pares de bases de longitud. El tamaño máximo de una molécula de ADN recombinante, particularmente un vector de expresión, está determinado principalmente por la conveniencia y el tamaño de vector que puede alojar una célula huésped, una vez que estén presentes todas las secuencias de ADN mínimas requeridas para la replicación y expresión, cuando se desee. Los tamaños de vector mínimos se conocen bien. No se prefieren los segmentos de ADN largos de este tipo, pero pueden usarse.
60 65

Puede sintetizarse un segmento de ADN que codifica una proteína de fusión descrita anteriormente mediante técnicas químicas, por ejemplo, el método del fosfotriéster de Matteucci *et al.*, 1981 J. Am. Chem. Soc., 103:3185. Naturalmente, sintetizando químicamente la secuencia codificante, puede realizarse cualquier modificación deseada modificando simplemente sustituyendo las bases apropiadas por aquellas que codifican para la secuencia de residuos de aminoácidos nativa. Sin embargo, se prefieren segmentos de ADN que incluyen las secuencias tratadas específicamente en el presente documento.

Los segmentos de ADN que contienen un gen que codifica la proteína de fusión se obtienen preferiblemente a partir de moléculas de ADN recombinantes (vectores plásmidos) que contienen ese gen. Un vector que dirige la expresión de un gen de una proteína de fusión en una célula huésped se denomina en el presente documento como "vector de expresión".

Un vector de expresión contiene elementos de control de la expresión que incluyen el promotor. El gen que codifica la proteína de fusión está operativamente unido al vector de expresión para permitir que la secuencia promotora dirija la unión de la ARN polimerasa y la expresión del gen que codifica para la proteína de fusión. Son útiles en la expresión del gen que codifica para el polipéptido, promotores que son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos tal como se describe por Paszkowski *et al.*, 1989 EMBO J., 3:2719 y Odell *et al.*, 1985 Nature, 313:810, así como regulados temporalmente, regulados espacialmente y regulados espaciotemporalmente tal como se facilita en Chua *et al.*, 1989 Science, 244:174-181.

Se contemplan en el presente documento vectores de expresión compatibles con células eucariotas, tales como los compatibles con células de mamíferos, algas o insectos y similares. Tales vectores de expresión también pueden usarse para formar las moléculas de ADN recombinantes de la presente invención. Los vectores de expresión de células eucariotas se conocen bien en la técnica y están disponibles a partir de varias fuentes comerciales. Normalmente, tales vectores contienen uno o más sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN y las secuencias promotoras deseadas. Opcionalmente, tales vectores contienen un marcador seleccionable específico para su uso en células eucariotas.

A continuación en el presente documento, se ilustra la producción de una proteína de fusión mediante la expresión de ADN recombinante en células de mamífero usando un vector de ADN recombinante que expresa el gen de la proteína de fusión en células huésped de ovario de hámster chino (CHO), huésped de mono Cos1 y células huésped 293T humanas. Esto se logra usando procedimientos que se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratories (1989).

También puede usarse un sistema de células de insecto para expresar una proteína de fusión contemplada. Por ejemplo, en un sistema de este tipo, se usa baculovirus o virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (VPNAc) como vector para expresar genes foráneos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican una proteína de fusión pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción satisfactoria de una secuencia de proteína de fusión hace inactivo el gen de la polihedrina y produce virus recombinante que carece de la proteína de la cubierta. Después pueden usarse los virus recombinantes para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que puede expresarse la proteína de fusión. E. Engelhard *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3224-3227; y V. Luckow, "Insect Cell Expression Technology", páginas 183-218, en Protein Engineering: Principles and Practice, J.L. Cleland *et al.* eds., Wiley-Liss, Inc, 1996). A menudo se expresan genes heterólogos situados bajo el control del promotor de la polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (VPNAc) a altos niveles durante las fases tardías de la infección.

Se construyen baculovirus recombinantes que contienen el gen de la proteína de fusión usando el sistema de vector lanzadera de baculovirus (Luckow *et al.*, 1993 J. Virol., 67:4566-4579), vendido comercialmente como el sistema de expresión de baculovirus Bac-To-Bac™ (Life Technologies). Se preparan disoluciones madre de virus recombinantes y se monitoriza la expresión de la proteína recombinante mediante protocolos convencionales (O'Reilly *et al.*, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1992; y King *et al.*, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman & Hall, Londres, 1992). También se contempla en la presente invención el uso de baculovirus u otros vectores de inserción en células de mamífero, tales como el sistema 'BacMam' descrito por T. Kost y colaboradores (véase, por ejemplo Merrihew *et al.*, 2004 Methods Mol Biol. 246:355-365), u otros sistemas de este tipo como conocen los expertos en la técnica.

La elección de qué vector de expresión y, en última instancia a qué promotor está operativamente unido un gen que codifica una proteína de fusión, depende directamente de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, la ubicación y el momento de la expresión de la proteína, y la célula huésped que va a transformarse. Estas son limitaciones bien conocidas inherentes en la técnica de construcción de moléculas de ADN recombinantes. Sin embargo, un vector útil en la práctica de la presente invención puede dirigir la replicación, y preferiblemente también la expresión (para un vector de expresión) del gen de la proteína de fusión incluido en el segmento de ADN al que está operativamente unido.

Se conocen bien en la técnica vectores típicos útiles para la expresión de genes en células de plantas superiores y mamíferos e incluyen vectores de plantas derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* descrito por Rogers *et al.* (1987) Meth. in Enzymol., 153:253-277 y los vectores de expresión de mamífero pKSV-10, anteriormente, y pCI-neo (Promega Corp., nº E1841, Madison, WI). Sin embargo, se conocen otros varios sistemas de vector de expresión que funcionan en plantas incluyendo el vector de control de transferencia pCaMVCN descrito por Fromm *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:58-24. El plásmido pCaMVCN (disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ) incluye el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor VMC.

Los sistemas de expresión en plantas anteriores normalmente proporcionan la expresión sistémica o constitutiva de un transgén insertado. La expresión sistémica puede ser útil cuando se usa la mayor parte o la totalidad de una planta como la fuente de los RPBLA y sus proteínas de fusión. Sin embargo, puede ser más eficaz expresar los RPBLA y su contenido de proteína de fusión en un órgano de reserva de la planta tal como una raíz, semilla o fruto a partir de cual pueden aislarse o ingerirse más rápidamente las partículas.

Una manera de conseguir la expresión en un órgano de reserva es usar un promotor que exprese su gen controlado en uno o más órganos no fotosintéticos de la planta preseleccionados o predeterminados. La expresión en uno o más órganos de reserva preseleccionados con poca o ninguna expresión en otros órganos tales como raíces, semillas o frutos frente a las hojas o tallos se denomina en el presente documento como expresión potenciada o preferente. Un promotor a modo de ejemplo que dirige la expresión en uno o más órganos preseleccionados en comparación con otro órgano a una razón de al menos 5:1 se define en el presente documento como un promotor potenciado para un órgano. La expresión sustancialmente sólo en un órgano y sustancialmente sin expresión en otros órganos de reserva se denomina como expresión específica de órgano; es decir, una razón de productos de expresión en un órgano de reserva con respecto a otro de aproximadamente 100:1 o superior indica especificidad de órgano. Por tanto, los promotores específicos de órganos de reserva son miembros de la clase de promotores potenciados para un órgano de reserva.

Los órganos de reserva de plantas a modo de ejemplo incluyen las raíces de las zanahorias, colocasia o mandioca, tubérculos de patata, y la pulpa de frutos tales como guayaba, maracuyá, mango, papaya, tomate, aguacate, cereza, mandarina, palma, melones tales como melón cantalupo y sandías y otros frutos carnosos como tales como calabaza, pepinos, mangos, albaricoques, melocotones, así como las semillas de maíz, semillas de soja, arroz, colza y similares.

El promotor 35S de VMC normalmente se considera que es un promotor constitutivo. Sin embargo, la investigación ha demostrado que una región de 21 pb del promotor 35S de VMC, cuando está operativamente unido a otro promotor de tejido verde habitual heterólogo, el promotor rbcS-3A, puede hacer que el promotor quimérico resultante se convierta en un promotor potenciado para la raíz. Esa secuencia de 21 pb se da a conocer en la patente estadounidense número 5.023.179. El promotor rbcS-3A quimérico que contiene el inserto de 21 pb de la patente estadounidense número 5.023.179 es un promotor potenciado para la raíz útil del presente documento.

Un promotor potenciado para la raíz similar, que incluye el segmento de 21 pb anterior es la región de -90 a +8 del propio promotor 35S del VMC. La patente estadounidense número 5.110.732 da a conocer que ese promotor 35S del VMC truncado proporciona una expresión potenciada en las raíces y el radical de semilla, un tejido destinado a convertirse en una raíz. Ese promotor es también útil en el presente documento.

Otro promotor potenciado para la raíz útil es el promotor -1616 a -1 del gen de la colza (*Brassica napus* L.) dado a conocer en el documento PCT/GB92/00416 (documento WO 91/13922 publicado el 19 de sept. de 1991). Se depositaron *E. coli* DH5.alfa. que contenían el plásmido pRlambdaS4 y el bacteriófago lambda.beta.I que contienen este promotor en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen, GB el 8 de marzo de 1990 y tienen los números de registro NCIMB40265 y NCIMB40266. Una parte útil de este promotor puede obtenerse como un fragmento de 1,0 kb mediante la escisión del plásmido con HaeIII.

Un promotor potenciado para la raíz preferido es el promotor de la manopina sintasa (mas) presente en el plásmido pKan2 descrito por DiRita y Gelvin (1987) Mol. Gen. Genet, 207:233-241. Este promotor puede eliminarse de su plásmido pKan2 como un fragmento de XbaI-XbaII.

El promotor potenciado para la raíz de la manopina sintasa preferido se compone de la región central del promotor de la manopina sintasa (mas) hasta la posición -138 y el activador de la manopina sintasa desde -318 hasta -213, y se denomina colectivamente como AmasPmas. Se ha encontrado que este promotor aumenta la producción en raíces de tabaco de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces en comparación con los niveles de expresión en las hojas.

Otro promotor específico de la raíz es la secuencia flanqueante en 5' de aproximadamente 500 pb que acompaña al gen de la glicoproteína rica en hidroxiprolina, HRGPnt3, expresado durante la iniciación de la raíz lateral y descrito por Keller *et al.* (1989) Genes Dev., 3:1639-1646. Otro promotor específico de la raíz preferido está presente en la región flanqueante en 5' de aproximadamente -636 a -1 del gen específico de la raíz del tabaco ToRBF descrito por

Yamamoto *et al.* (1991) *Plant Cell*, 3:371-381. Los elementos de acción en cis que regulan la expresión están ubicados más específicamente por estos autores en la región desde aproximadamente -636 hasta aproximadamente -299 en 5' desde el sitio de iniciación de la transcripción. Yamamoto y col. describieron la producción de ARNm en estado estacionario a partir del gen ToRBF en las raíces, pero no en las hojas, tallos o meristemos de brotes.

Todavía otro promotor específico de órgano de reserva útil son las regiones flanqueantes en 5' y 3' del gen de maduración de frutos E8 del tomate, *Lycopersicon esculentum*. Estas regiones y sus secuencias de ADNc se ilustran y tratan en Deikman *et al.* (1988) *EMBO J.*, 7(11):3315-3320 y (1992) *Plant Physiol.*, 100:2013-2017.

Tres regiones están ubicadas en las 2181 pb de la secuencia flanqueante en 5' del gen y una secuencia de 522 pb en 3' al sitio de poliadición (A) que parece que controlan la expresión del gen E8. Se requiere una región desde -2181 hasta -1088 para la activación de la transcripción del gen E8 en frutos no maduros mediante etileno y también contribuye a la transcripción durante la maduración. Otras dos regiones, de -1088 a -863 y de -409 a -263, no pueden conferir capacidad de respuesta al etileno en frutos no maduros pero son suficientes para la expresión del gen E8 durante la maduración.

Se ha descrito que el promotor de la sacarosa sintasa 1 (Sh) del maíz que expresa en el maíz su enzima controlada a altos niveles en el endospermo, a niveles muy reducidos en las raíces y no lo hace en los tejidos verdes ni en el polen, expresa un gen indicador quimérico, β -glucuronidasa (GUS), específicamente en células del floema del tabaco que son abundantes en los tallos y las raíces. Yang *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 87:4144-4148. Por tanto, este promotor es útil para órganos de plantas tales como frutos carnosos como los melones, por ejemplo melón cantalupo, o semillas que contienen endospermo y para raíces que tienen altos niveles de células del floema.

Otro promotor específico de tejido a modo de ejemplo es el promotor de la lectina, que es específico para el tejido de la semilla. La proteína lectina en semillas de soja está codificada por un único gen (Le1) que sólo se expresa durante la maduración y representa de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 5 por ciento del ARNm de semilla total. El gen de la lectina y el promotor específico de semilla se han caracterizado completamente y usado para dirigir la expresión específica de semilla en plantas de tabaco transgénicas. Véase, por ejemplo, Vodkin *et al.* (1983) *Cell*, 34:1023 y Lindstrom *et al.* (1990) *Developmental Genetics*, 11:160.

Un promotor de la expresión específico de tubérculo particularmente preferido es la región flanqueante en 5' del gen de la patatina de la patata. El uso de este promotor se describe en Twell *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.*, 9:365-375. Este promotor está presente en un fragmento de aproximadamente 406 pb del bacteriófago LPOTI. El promotor de LPOTI tiene regiones con una homología superior al 90 por ciento con cuatro otros promotores de la patatina y una homología de aproximadamente el 95 por ciento a lo largo de las 400 bases con el promotor de la patatina PGT5. Cada uno de estos promotores es útil en el presente documento. Véase, también, Wenzler *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.*, 12:41-50.

Se dan a conocer todavía otros promotores específicos de órgano y potenciados para un órgano de plantas superiores en Benfey *et al.* (1988) *Science*, 244:174-181.

Cada una de las secuencias promotoras utilizadas no se ve sustancialmente afectada por la cantidad de RPBLA en la célula. Tal como se usa en el presente documento, el término "no se ve sustancialmente afectada" significa que el promotor no responde al control por retroalimentación directo (inhibición) por los RPBLA acumulados en las células transformadas o planta transgénica.

La transfección de células vegetales usando *Agrobacterium tumefaciens* normalmente se lleva a cabo mejor en plantas dicotiledóneas. Normalmente las monocotiledóneas se transforman más fácilmente mediante la denominada transferencia génica directa de protoplastos. Normalmente, la transferencia génica directa se lleva a cabo mediante electroportación, mediante transferencia mediada por polietilenglicol o bombardeo de células mediante microproyectiles que llevan el ADN necesario. Estos métodos de transfección se conocen en la técnica y no es necesario tratarlos adicionalmente en el presente documento. También se conocen bien los métodos de regeneración de plantas completas a partir de células transfectadas y protoplastos, ya que son técnicas para obtener una proteína deseada a partir de tejidos vegetales. Véanse, también, las patentes estadounidenses números 5.618.988 y 5.679.880 y las citas en ellas.

Una planta transgénica formada usando transformación con *Agrobacterium*, electroportación u otros métodos normalmente contiene una única copia en un cromosoma. Tales plantas transgénicas pueden referirse que son heterocigóticas para el gen añadido. Sin embargo, dado que el uso de la palabra "heterocigótico" normalmente implica la presencia de un gen complementario en el mismo locus del segundo cromosoma de un par de cromosomas, y no existe tal gen en una planta que contiene un gen añadido como en este caso, se cree que un nombre más preciso para una planta de este tipo es segregante independiente, porque el gen añadido, que codifica para una molécula quimérica exógena se segrega independientemente durante la mitosis y la meiosis. Una planta transgénica que contiene un promotor potenciado para un órgano que dirige un único gen estructural que codifica para una molécula quimérica HBc contemplada; es decir, un segregante independiente, es una planta transgénica preferida.

Se prefiere más una planta transgénica que es homocigótica para el gen estructural añadido; es decir, una planta transgénica que contiene dos genes añadidos, un gen en el mismo locus en cada cromosoma de un par de cromosomas. Una planta transgénica homocigótica puede obtenerse mediante la fecundación sexual (autofecundación) de una planta transgénica segregante independiente que contiene un único gen añadido, la germinación de parte de las semillas producidas y el análisis de las plantas resultantes producidas para determinar la acumulación potenciada de partículas quiméricas con respecto a un control (nativo, no transgénico) o una planta transgénica segregante independiente. Una planta transgénica homocigótica muestra una acumulación potenciada de partículas quiméricas en comparación tanto con una planta nativa, no transgénica como con una planta transgénica segregante independiente.

Ha de entenderse que dos plantas transgénicas diferentes también pueden fecundarse para producir descendencia que contiene dos genes exógenos (heterólogos) añadidos, segregantes de manera independiente. La autofecundación de la progenie apropiada puede producir plantas que son homocigóticas para ambos genes exógenos añadidos que codifican para una molécula de HBc quimérica. También se contemplan el retrocruzamiento con una planta parental y el exocruzamiento con una planta no transgénica.

Por tanto, una planta transgénica de esta invención tiene un gen estructural heterólogo que codifica para una molécula de HBc quimérica contemplada. Una planta transgénica preferida es un segregante independiente para el gen estructural HBc quimérico heterólogo añadido y puede transmitir ese gen a su progenie. Una planta transgénica más preferida es homocigótica para el gen heterólogo, y transmite ese gen a toda su descendencia con la fecundación sexual.

Los RPBLA expresados y sus proteínas de fusión pueden obtenerse a partir de las células huésped que expresan mediante medios habituales utilizados en la recuperación bioquímica o biológica. Dado que los RPBLA son densos con relación a las demás proteínas presentes en las células huésped, los RPBLA son particularmente adecuados para recogerse mediante centrifugación de un homogeneizado celular.

Por tanto, se forman regiones de diferente densidad en el homogeneizado para proporcionar una región que contiene una concentración relativamente aumentada de los RPBLA y una región que contiene una concentración relativamente reducida de los RPBLA. Se separa la región reducida en RPBLA de la región de concentración relativamente aumentada de RPBLA, purificando así dicha proteína de fusión. La región de concentración relativamente aumentada de RPBLA posteriormente puede recogerse o puede tratarse con uno o más reactivos o someterse a uno o más procedimientos antes del aislamiento de los RPBLA o la proteína de fusión en ellos. En algunas realizaciones, los RPBLA recogidos se usan tal cual, sin la necesidad de aislar la proteína de fusión, tal como cuando se usan los RPBLA como vacuna oral. La proteína de fusión que contiene el polipéptido biológicamente activo puede obtenerse a partir de los RPBLA recogidos mediante disolución de la membrana circundante en un tampón acuoso que contiene un detergente y un agente reductor tal como se trató previamente. Los agentes reductores ilustrativos incluyen 2-mercaptoetanol, ácido tioglicólico y sales de tioglicolato, ditiotreitól (DTT), iones sulfito o bisulfito, seguido por métodos habituales de aislamiento de proteínas. El dodecilsulfato de sodio (SDS) es el detergente preferido, aunque pueden usarse otros tensioactivos iónicos (desoxicolato, 'N-lauroilsarcosina, y similares), no iónicos (Tween[®] 20, Nonidet[®] P-40, octil-glucósido y similares) y zwitteriónicos (CHAPS, Zwittergent[™] serie 3-X y similares). Se utiliza una cantidad mínima de tensioactivo que disuelve o dispersa la proteína de fusión.

VACUNAS E INÓCULOS

En una realización de la invención, se usan los RPBLA como el inmunógeno de un inóculo o vacuna en un paciente humano o huésped animal adecuado tal como un chimpancé, ratón, rata, caballo, oveja, bovino, perro, gato o similar. Un inóculo puede inducir una respuesta de células B o células T (estimulación) tal como la producción de anticuerpos que inmunoreaccionan con el epítipo inmunogénico o determinante antigénico, o la activación de células T frente a tal epítipo, mientras que una vacuna proporciona protección frente a la entidad de la que se ha derivado el inmunógeno a través de una o ambas de una respuesta de células B o células T.

Los RPBLA de la vacuna o inóculo contemplados parecen actuar sobre las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como células dendríticas y monocitos/macrófagos que engloban los RPBLA y procesan su contenido. Al actuar sobre estos tipos de células, los RPBLA mejoran la administración del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Esos RPBLA también mejoran el procesamiento y la presentación del antígeno a células presentadoras de antígeno.

Por tanto, la invención contempla una vacuna o inóculo que comprende una cantidad inmunogénica eficaz de productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante (RPBLA) que se disuelven o se dispersan en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los RPBLA contienen una proteína de fusión recombinante, proteína de fusión recombinante que contiene ella misma dos secuencias unidas entre sí en las que una secuencia es una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y la otra es un polipéptido biológicamente activo frente al que va a inducirse una respuesta inmunológica mediante dicha vacuna o inóculo, en donde la PBIS es la de un compuesto

prolamina para su uso en la generación de una respuesta inmune de células B o células T en un animal huésped contra el polipéptido inmunógeno.

La activación de células T puede medirse mediante una variedad de técnicas. En la práctica habitual, se inocula un animal huésped con una vacuna o inóculo de RPBLA contemplado, y posteriormente se recogen las células mononucleares de sangre periférica (PMBC). Esas PMBC se cultivan entonces *in vitro* en presencia del polipéptido biológicamente activo (inmunógeno para células T) durante un periodo de aproximadamente tres a cinco días. Después las PMBC cultivadas se someten a ensayo para determinar la proliferación o secreción de una citocina tal como IL-2, GM-CSF de IFN- γ . Se conocen bien en la técnica ensayos para la activación de células T. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.478.726 y la técnica citada en ella.

Usando la formación de anticuerpos a modo de ejemplo, el inóculo o vacuna contemplado comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de RPBLA que se disuelven o se dispersan en una composición de diluyente farmacéuticamente aceptable que normalmente también contiene agua. Cuando se administran a un animal huésped en el que va a inducirse una respuesta inmunológica frente al polipéptido biológicamente activo mediante la vacuna o inóculo, tal como un animal huésped que necesita inmunización o en el que se desea inducir anticuerpos, tal como un mamífero (por ejemplo, un ratón, perro, cabra, oveja, caballo, bovino, mono, simio o ser humano) o ave (por ejemplo, una gallina, pavo, pato u oca), un inóculo induce anticuerpos que inmunoreaccionan con uno o más determinantes antigénicos del polipéptido biológicamente activo diana.

La cantidad de inmunógeno de RPBLA utilizada en cada inmunización se denomina cantidad inmunogénicamente eficaz y puede variar ampliamente, dependiendo entre otros, del inmunógeno de RPBLA, el paciente inmunizado y la presencia de un adyuvante en la vacuna, tal como se trata a continuación. Las cantidades inmunogénicamente eficaces para una (i) vacuna y un (ii) inóculo proporcionan la (i) protección o (ii) actividad de células T o anticuerpos, respectivamente, tratados anteriormente en el presente documento.

Las vacunas o inóculos contienen normalmente una concentración de inmunógeno de RPBLA de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 1 miligramo por inoculación (dosis unitaria), y preferiblemente de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 50 microgramos por dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" dado que pertenece a una vacuna o inóculo de la presente invención se refiere unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para animales, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir individual o colectivamente el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, excipiente, o vehículo.

Las vacunas o inóculos se preparan normalmente a partir de un inmunógeno de RPBLA recuperado dispersando el inmunógeno, en forma particulada, en un vehículo diluyente fisiológicamente tolerable (aceptable) tal como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina tamponada con acetato (ABS), disolución de Ringer, o similares para formar una composición acuosa. El vehículo diluyente también puede incluir materiales oleaginosos tales como aceite de cacahuete, escualano, o escualeno tal como se trata a continuación en el presente documento.

También se comprende bien en la técnica la preparación de inóculos y vacunas que contienen materiales proteicos como principios activos. Normalmente, tales inóculos o vacunas se preparan como composiciones parenterales, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución en, o la suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, lo que se prefiere particularmente.

Los RPBLA inmunogénicamente activos se mezclan a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, un inóculo o vacuna puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH que potencian la eficacia inmunogénica de la composición.

La palabra "antígeno" se ha usado históricamente para designar una entidad que se une por un anticuerpo o receptor, y también para designar la entidad que induce la producción del anticuerpo. Una utilización más actual limita el significado de antígeno a la entidad unida por un anticuerpo o receptor, mientras que se usa la palabra "inmunógeno" para la entidad que induce la producción de anticuerpos o se une al receptor. Cuando una entidad tratada en el presente documento es tanto inmunogénica como antigénica, normalmente se hace referencia a ella o bien como un inmunógeno o bien como un antígeno según su utilidad pretendida.

"Determinante antigénico" se refiere a la parte estructural real del antígeno que se une inmunológicamente por un sitio de combinación de anticuerpo o receptor de células T. El término también se usa de manera intercambiable con "epítipo".

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión" designa un polipéptido que contiene al menos dos secuencias de residuos de aminoácidos que no se encuentran normalmente unidas entre sí en la

naturaleza, que están operativamente unidas entre sí extremo con extremo (cabeza con cola) mediante un enlace peptídico entre sus respectivos residuos de aminoácido carboxi y amino-terminales. Las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento son quimeras de una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) unida a una segunda secuencia que es un producto (por ejemplo, péptido o proteína) de un polipéptido biológicamente activo de interés (diana).

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los ejemplos detallados siguientes, utilizar la presente invención en su mayor extensión. Por lo tanto, las siguientes realizaciones específicas preferidas han de interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la descripción de ninguna manera en absoluto.

Ejemplo 1: Acumulación de proteínas de fusión derivadas de RX3-ECFP en fracciones densas de células de mamífero transfectadas

La secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia codificante de gamma-zeína N-terminal RX3 (documento WO2004003207) se fusionó directamente, o a través de un enlazador que consistía en cinco glicinas, al extremo 5' de la secuencia que codifica ECFP, una variante fluorescente cian de GFP. Esas construcciones (figura 1A) que codifican las proteínas de fusión RX3-ECFP o RX3-Gx5-ECFP se introdujeron en células de mamífero en cultivo CHO mediante el método de transfección basado en Lipofectamina (Invitrogen). Se usaron como controles, células CHO transfectadas con plásmido pECFP-N1 (Clontech) que contiene la secuencia génica de la ECFP citosólica.

Se cargaron extractos de células de mamífero transfectadas en gradientes escalonados de densidad y se centrifugaron. La acumulación de proteínas recombinantes en las diferentes fracciones se analizó mediante inmunotransferencia (figura 2A). Los resultados mostrados en esa figura indican que RX3-ECFP y RX3-Gx5-ECFP aparecieron en las fracciones F42, F56 y P que corresponden a RPBLA densos, (figura 2A, carriles 3-5). Este resultado demuestra que las proteínas de fusión pueden ensamblarse e inducir la formación de RPBLA. También se detectó cierta cantidad de proteína de fusión en la fracción del sobrenadante (figura 2A, carril 1), que representa probablemente proteínas de fusión de los RPBLA solubilizados parcialmente durante el proceso de extracción, o proteínas de fusión recién sintetizadas que no se habían ensamblado.

Por el contrario, cuando se cargó el extracto de células de mamífero transfectado con el plásmido de control pECFP-N1 en los mismos gradientes escalonados de densidad, se observó la proteína ECFP exclusivamente en el sobrenadante. No se detectaron trazas de ECFP en las fracciones densas, lo que indica que la ECFP por sí misma no puede agregarse y formar estructuras de tipo PB.

Ejemplo 2: Acumulación de ECFP activa fusionada a dominios de PBIS en los RPBLA de células de mamífero transfectadas

Para determinar si las proteínas de fusión RX3-ECFP, RX3-Gx5-ECFP y 22aZ-ECFP son activas dentro de los RPBLA, se realizaron análisis mediante microscopía confocal en células CHO transfectadas con las construcciones que las codifican (figura 1A). Se recogieron imágenes fluorescentes cian a una excitación de 458 nm con el láser de ion argón usando un ajuste de la ventana de emisión a 470-530 nm. Tal como se muestra en la figura 3, las correspondientes proteínas de fusión, RX3-ECFP (figura 3A) y RX3-Gx5-ECFP (figura 3B) y 22aZ-ECFP (figura 3D), se detectaron en el retículo endoplásmico, lo que indica que el péptido señal de la gamma-zeína y la alfa-zeína es funcional en células de mamífero en las que media la translocación de la proteína de fusión en el RE.

Es importante observar que las proteínas de fusión sorprendentemente parecen estructuras esféricas densas y grandes acumuladas de manera preferente que se asemejan enormemente tanto a los PB naturales de semilla de cereal como a los RPBLA en los sistemas heterólogos visualizados mediante inmunodetección. La intensa fluorescencia observada en estas estructuras indica que la proteína de fusión permanece plegada apropiadamente, y por lo tanto activa, a pesar de estar altamente empaquetada dentro de los RPBLA. También es importante observar que los dominios RX3, así como otras secuencias inductoras de cuerpos proteicos (PBIS) responsables de la formación de PB y estructuras de tipo PB contienen múltiples residuos de cisteínas. Aunque podría preverse que tales cisteínas podrían formar enlaces disulfuro con cisteínas de proteínas diana y así interferir con el plegamiento apropiado de las proteínas diana, no se observó que este fuera el caso. Se observaron tanto proteína diana activa (fluorescencia de ECFP) como PBIS funcionales (formación de RPBLA).

Como control, se usó la construcción pECFP-N1 para transfectar células CHO. La expresión de una ECFP citosólica mostró un patrón de fluorescencia homogéneo a lo largo de toda la célula, incluyendo el núcleo (figura 3C).

Ejemplo 3: Localización subcelular de otras proteínas fluorescentes fusionadas a RX3 en células CHO.

Se analizó la localización subcelular de las proteínas de fusión RX3-DsRED y RX3-GFP en células CHO transfectadas de manera transitoria mediante microscopía confocal para analizar si otras proteínas fluorescentes distintas a ECFP fusionadas a RX3 están plegadas apropiadamente dentro de los RPBLA y son bioactivas. Es importante observar que DsRED no comparte homología con ECFP, lo que implica un mecanismo de plegamiento

completamente diferente. Se obtuvieron micrografías de las células transfectadas usando microscopio láser de barrido confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemania) equipado con espectrofotómetros para la selección de la longitud de onda de la banda de emisión. Se recogieron imágenes fluorescentes verdes a una excitación de 488 nm con el láser de ion argón usando un ajuste de la ventana de emisión a 495-535 nm. Se recogieron imágenes fluorescentes rojas tras excitación a 543 nm con un láser de HeNe y una ventana de emisión de 550-600. Las secciones ópticas eran de 0,5 µm de espesor.

La expresión de las proteínas de fusión RX3-GFP (figura 3E) y RX3-DsRED (figura 3F) en células CHO produjo una gran cantidad de RPBLA de forma redonda altamente fluorescentes. Estos resultados confirman que ambas proteínas de fusión están plegadas apropiadamente y son activas dentro de los RPBLA.

Ejemplo 4: Localización subcelular de proteínas de fusión de RX3 fluorescentes en plantas e insectos

Con el fin de analizar si células huésped distintas a células CHO pueden producir RPBLA que contienen proteínas fluorescentes activas fusionadas a dominios RX3, se transformaron de manera transitoria plantas de tabaco con RX3-GFP mediante agroinfiltración con jeringa. El análisis mediante microscopía confocal de las células epidérmicas (figuras 4A y 4B) mostró la presencia de una gran cantidad de RPBLA fluorescentes. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron células del mesófilo de tabaco transformadas.

Se obtuvieron resultados similares cuando se infectaron larvas de insecto o células de insecto SF9 de *Spodoptera (Trichoplusia ni)* con baculovirus que codifica la proteína de fusión RX3-DsRED. Tal como se muestra en la figura 4C, la proyección de las secciones ópticas de las células de insecto infectadas acumulaba una gran cantidad de RPBLA fluorescentes de aproximadamente 0,5 micrómetros de diámetro que contenían la proteína de fusión RX3-DsRED activa. El análisis confocal de las larvas infectadas también mostró una cantidad impresionante de RPBLA fluorescentes en cualquiera que fuese el tejido analizado. En la figura 4D, células de grasa de las larvas infectadas mostraron RPBLA que contenían RX3-DsRED activa. De manera interesante, no se observó fluorescencia de DsRED en hemolinfa de insectos, lo que sugiere que la proteína expresada permaneció secuestrada completamente dentro de los RPBLA.

Ejemplo 5: Actividad de RX3-hGH ensamblada en los RPBLA en células CHO.

Se emprendieron estudios para determinar la actividad de hormona de crecimiento humana (hGH) producida en los RPBLA. Se eligió la hGH porque esta molécula contiene 2 enlaces disulfuro que son importantes para el plegamiento apropiado de la proteína. El dominio RX3 también contiene residuos de cisteína implicados en enlaces disulfuro que son esenciales para el ensamblaje y la estabilización de los RPBLA, que podrían interferir en el plegamiento apropiado de la hGH.

La construcción p3.1-RX3-hGH se introdujo en células CHO mediante transfección transitoria con el protocolo de Lipofectamina (Invitrogen). Cuatro días después de la transfección se fijaron las células, se permeabilizaron y se incubaron con anti-RX3 o un antisuero anti-hGH (figuras 5A y 5B, respectivamente) y el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Se observó la presencia de RPBLA grandes (1-3 micrómetros) que contenían la proteína de fusión RX3-hGH mediante análisis de microscopía óptica independientemente del anticuerpo primario usado.

Con el fin de corroborar que los RPBLA eran orgánulos densos tal como se describió previamente, se homogeneizaron células CHO que expresaban RX3-hGH, y se cargaron los homogeneizados en un gradiente escalonado de densidad y se centrifugaron tal como se describe en otra parte. Se analizó la acumulación de RX3-hGH en las diferentes fracciones mediante inmunotransferencia. Tal como puede observarse, parte de la proteína de fusión estaba presente en el sobrenadante, representando RX3-hGH no ensamblada, pero la mayor parte de la proteína de fusión se detectó en la fracción F56 que corresponde a RPBLA densos (figura 2B, carriles 2 y 5, respectivamente).

Esta fracción F56 se diluyó 3 veces con tampón PBP4 (Tris 100 mM, pH 7,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM) y se centrifugó a 80000 x g en un rotor oscilante para recuperar los RPBLA en el sedimento. La presencia de hGH se cuantificó usando un ensayo ELISA (Elisa para hormona de crecimiento humana Active® – DSL-10-1900; Diagnostic Systems Laboratories, Inc), que pudo detectar la hGH incluso en presencia de la membrana de RPBLA intacta.

Se aplicó esta misma muestra a un ensayo de bioactividad (Elisa para hormona de crecimiento humana bioactiva Active® – DSL-10-11100; Diagnostic Systems Laboratories, Inc). Este ensayo de bioactividad se basa en la capacidad de la hGH plegada apropiadamente para interactuar con una proteína de unión a hGH proporcionada por el kit, dependiendo esta interacción de una conformación funcional de la hGH. La muestra dio un resultado positivo a 24 ng/ml de proteína bioactiva. Las proteínas hGH evidentemente estaban plegadas apropiadamente y se presentaban sobre la superficie externa de los RPBLA densos. La eliminación de la membrana que rodea los RPBLA mediante el lavado de la preparación con Tris 50 mM, pH 8 y Triton X-100 al 1% y mediante sonicación a una amplitud del 50% y un ciclo del 50% durante 1 minuto, repetido 5 veces (Ikasonic U200S – IKA Labortechnik) dio

como resultado mayor actividad específica (45 ng/ml) debido a la exposición de moléculas de hGH adicionales sobre la superficie de los agregados.

En la determinación de la actividad de hGH fusionada a RX3, la proteína de fusión se solubilizó a partir de RPBLA aislados mediante gradiente de densidad (F56, diluido 3 veces con tampón PBP4 y centrifugado a 80000 x g en un rotor oscilante durante 2 horas). La proteína de fusión se solubilizó en tampón S (Tris 50 mM, pH 8 y un 2% de β -ME) y se sonicó (ciclo 5, amplitud del 50%, 1 minuto, repetido cinco veces; Ikasonic U200S – IKA Labortechnik). Tras la incubación a 37°C durante 2 horas, se centrifugó la muestra a 5000 x g durante 10 minutos, y se sometió a ensayo el sobrenadante que contenía la proteína de fusión RX3-hGH soluble para cuantificar y evaluar el componente bioactivo de la fracción. Se determinó que la cantidad de proteína de fusión en el sobrenadante era de 250 ng/ml mediante ELISA (ELISA para hormona de crecimiento humana Active® – DSL-10-1900; Diagnostic Systems Laboratories, Inc). La proteína ensayada en el ensayo ELISA de bioactividad (ELISA para hormona de crecimiento humana bioactiva Active® – DSL-10-11100; Diagnostic Systems Laboratories, Inc) dio un resultado de 70 ng/ml, lo que indica que aproximadamente el 30% de la proteína de fusión RX3-hGH es activa. La pérdida de actividad de hGH podría ser una consecuencia de la alta concentración de agente reductor usado en la solubilización, o debido a cierto efecto de alteración del dominio RX3 sobre la hGH o la proteína de unión a hGH.

Finalmente, la proteína de fusión RX3-hGH se escindió mediante una proteasa específica del sitio para liberar la hGH de la proteína de fusión. La proteína de fusión RX3-hGH solubilizada se diluyó 2 veces y se realizó la digestión con EKmax tal como se describe por el fabricante (Invitrogen). Después de eso, se aisló la hGH libre de la proteína de fusión sin escindir (insoluble) mediante centrifugación a 16000 x g a 4°C durante 1 hora. Se recuperó la hGH soluble del sobrenadante y se aplicó a los ensayos de cuantificación y bioactividad de Diagnostic Systems Laboratories. Sorprendentemente, los resultados de ambos de estos kits dio el mismo valor de 90 ng/ml para los ensayos ELISA de cuantificación y bioactividad (ELISA para hormona de crecimiento humana Active® – DSL-10-1900; Diagnostic Systems Laboratories, Inc) y ELISA para hormona de crecimiento humana bioactiva Active® – DSL-10-11100; Diagnostic Systems Laboratories, Inc) indicando que toda la proteína presente detectada mediante el kit de cuantificación también se determina que es bioactiva.

A continuación se presenta la tabla resumen para la cuantificación y bioactividad de la proteína hGH en todas las formulaciones:

	Cuantificación	Bioactividad
Formulación	Cantidad ng/ml	Cantidad ng/ml
RPBLA intactos	14	25
RPBLA con la membrana eliminada	35	45
RX3-hGH soluble	250	70
hGH escindida	90	90

Es importante observar que se usaron como control negativo, células CHO transfectadas de manera estable con el vector p3.1-RX3. Tal como se muestra en la figura 2B, la expresión de RX3 en células CHO también se acumula en estructuras densas que pueden aislarse mediante un gradiente escalonado de densidad en F56 (figura 2B, carril 5). Además, el análisis óptico de células CHO transfectadas con p3.1-RX3, mostró que la proteína RX3 se acumula en los RPBLA (figura 5C). Estas preparaciones de RPBLA de RX3 control y proteína RX3 aislada no mostraron actividad de hGH en el ensayo ELISA de bioactividad.

Ejemplo 6: Actividad de inteína de ADNb tras la solubilización de RX3-Int-hGH a partir de los RPBLA de células CHO

La secuencia de polinucleótido que codifica la inteína de ADNb Ssp (New England Biolabs) se fusionó en el mismo marco de lectura al extremo 3' de la secuencia RX3 (documento WO2004003207), y al extremo 5' del ADNc de hGH. La construcción resultante se clonó en el vector pcDNA3.1(-) [figura 1A] para formar el vector p3.1-RX3-I-hGH. Como control negativo, se produjo una versión inactiva de la misma inteína mediante PCR en la que se mutó el residuo de aminoácido Asp154 a Ala [figura 1A] para formar el vector p3.1-RX3-Im-hGH. Se ha notificado que el residuo de aminoácido Asp154 es esencial para la actividad de autoescisión del ADNb de SSp (Mathys *et al*, GENE (1999) 231:1-13).

El análisis inmunológico de células CHO transfectadas con p3.1-RX3-I-hGH usando antisuero anti-hGH reveló que la proteína de fusión RX3-Int-hGH se acumulaba en grandes RPBLA de forma redonda, de manera similar a los observados en células CHO que expresan RX3-hGH (compárense las figuras 5B y 5D). Este resultado indica que la proteína de fusión que contiene la inteína de ADNb se autoensambla y se acumula en las estructuras de alta densidad.

Se homogeneizaron células CHO transfectadas con p3.1-RX3-I-hGH, se cargaron los homogeneizados en gradientes escalonados de densidad, y se analizaron las fracciones que correspondían a las diferentes densidades

mediante inmunotransferencia. La mayor parte de la RX3-I-hGH se detectó en la fracción F56 que correspondía a RPBLA densos (figura 2B). Como para otras proteínas de fusión de RX3, la presencia de la proteína de fusión RX3-I-hGH en el sobrenadante representa probablemente la proteína de fusión no ensamblada contenida en el RE y solubilizada durante el proceso de homogeneización.

Una vez que se demostró que la RX3-I-hGH se acumulaba en los RPBLA, se aislaron estos orgánulos derivados del RE mediante centrifugación a baja velocidad tal como se describe en otra parte en el presente documento. La centrifugación de los homogeneizados de células CHO transfectadas con p3.1-RX3-I-hGH a 1500 x g durante 10 minutos permitió la separación de las proteínas de fusión RX3-Int-hGH no ensambladas en el sobrenadante de las ensambladas en los RPBLA en el sedimento. Se realizaron estudios equivalentes con células CHO que expresaban la proteína de fusión RX3-mInt-hGH inactiva.

Se solubilizaron los sedimentos que contenían las proteínas de fusión RX3-Int-hGH y RX3-mInt-hGH ensambladas en tampón S1 (Tris 20 mM, pH7, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0,1% y TCEP 0,1 mM) a 37°C durante 2 horas, y se indujo la actividad enzimática de inteína mediante incubación a 25°C durante 48 horas tras diálisis frente al tampón de inducción de escisión: Tris 20 mM, pH 7, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM. Tras la inducción de la autoescisión de la inteína, se centrifugó la composición a 16000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante y el sedimento se analizaron mediante inmunotransferencia usando antisuero anti-hGH y anti-RX3.

Se solubilizaron ambas proteínas de fusión, pero sólo la proteína de fusión que contenía la inteína activa (RX3-Int-hGH) pudo autoescindirse (figuras 6A y 6B, puntas de flecha negras). La ausencia de autoescisión de la proteína de fusión RX3-mInt-hGH mutada demuestra que la autoescisión observada con la RX3-Int-hGH se debe a la actividad específica de la inteína, y no se debe a cierta actividad proteasa endógena purificada conjuntamente durante el proceso de aislamiento de los RPBLA.

Para optimizar la eficacia de la autoescisión de la inteína, se ensayaron protocolos de solubilización alternativos. La autoescisión de la inteína de la RX3-Int-hGH puede compararse, tras la solubilización con el tampón S1 y el protocolo de extracción bifásica (S2) descrito en otra parte (figura 6C). A partir de la razón entre el remanente de la proteína de fusión de longitud completa y la aparición de la banda que corresponde a la hGH liberada, aunque el protocolo de extracción bifásica era el más eficaz permitiendo más del 50% de escisión, puede concluirse que en ambos casos, una gran proporción de inteína de ADN_b era activa y podía autoescindirse.

Ejemplo 7: Actividad de RX3-EGF ensamblada en los RPBLA en plantas de tabaco

Se aislaron los RPBLA de plantas de tabaco transgénicas que expresaban la proteína de fusión RX3-EGF mediante centrifugación a baja velocidad esencialmente tal como se describe en el documento US11/289.264. La proteína de fusión se solubilizó mediante sonicación (ciclo 5, amplitud del 50%, 1 minuto, repetido cinco veces; Ikasonic U200S – IKA Labortechnik) en Tris 50 mM, pH 8 y un 2% de β -ME e incubación a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, el material solubilizado se centrifugó a 16000 x g a 4°C durante 30 minutos para descartar la proteína de fusión sin solubilizar en el sedimento. El sobrenadante se dializó frente a Tris 50 mM, pH 8 para eliminar el β -ME, se centrifugó de nuevo a 16000 x g a 4°C durante 30 minutos, y el sobrenadante se cuantificó mediante el kit de hEGF de Biosource International Inc. (KHG0062).

Se analizó la bioactividad de EGF determinando la tasa de proliferación (incorporación de timidina radioactiva a ADN) de células MDA-MB231 (células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor de EGF) incubadas con 1,2 ng/ml de proteína de fusión RX3-EGF. Como control positivo, se incubaron células MDA-MB231 con 10 ng/ml de EGF comercial (Promega) o suero fetal de ternera (SFT). Los resultados, resumidos en la siguiente tabla se representan como el porcentaje (%) de proliferación con respecto a la tasa de proliferación basal de células MB231 (100%), determinado como la tasa de proliferación de estas células cultivadas en ausencia de EGF (carentes).

Proliferación de células MDA-MB231

Muestra	Concentración	% de proliferación con respecto a células carentes	
		Media	DE
Carente	-	100	-
FCS	-	145	1,27
EGF (Promega)	10 ng/ml	158	11,7
RX3-EGF	1,2 ng/ml	146	4

Tal como se esperaba, la complementación del cultivo de células MB231 con EGF comercial (Promega) o el FCS produjo un aumento significativo de la tasa de proliferación (158% y 145%, respectivamente). Inesperadamente, la adición de 1,2 ng/ml de RX3-EGF también produjo un aumento del 146% de la tasa de proliferación. Es importante observar que se observó casi la misma tasa de proliferación con 10 veces más concentración de EGF comercial que con RX3-EGF. Este sorprendente resultado podría explicarse mediante resultados previos que muestran que se observó la saturación de la tasa de proliferación de células MB231 a 5 ng/ml del EGF comercial. Otra posible explicación podría ser una conformación más activa de EGF cuando se fusiona a RX3. En cualquier caso, este resultado muestra que RX3-EGF es al menos tan activa como el EGF comercial (Promega).

Ejemplo 8: Actividad de RX3-GUS ensamblada en los RPBLA en células CHO.

La enzima β -glucuronidasa (GUS) es una proteína indicadora ampliamente usada (Gilisen *et al.*, Transgenic Res. (1998) 7(3):157-163). La expresión de una proteína de fusión RX3-GUS activa en los RPBLA era un reto, principalmente por la presencia de 9 residuos de aminoácido de cisteína, y también porque es una proteína grande (aproximadamente de 70 kDa).

La secuencia de polinucleótido que codifica para RX3 (documento WO2004003207) se fusionó en el mismo marco de lectura al extremo 5' de la secuencia que codifica para GUS (figura 1A, RX3-GUS), y la construcción resultante se usó para transfectar células CHO tal como se describe en el ejemplo 7.

El análisis inmunoquímico de células CHO transfectadas con p3.1-RX3-GUS incubadas con antisuero anti-RX3 reveló la presencia de RPBLA grandes (Figura 5E). Para verificar la densidad de esos RPBLA, se homogeneizaron células CHO transfectadas con el mismo plásmido y posteriormente se cargaron en gradientes escalonados de densidad. El análisis de las diferentes fracciones mediante inmunotransferencia mostró que las proteínas de fusión se localizaban en las fracciones densas superiores (figura 2B, F56), lo que indica que las proteínas de fusión RX3-GUS pueden ensamblarse y acumularse en los RPBLA densos. Es importante observar que no se detectó proteína de fusión en el sobrenadante, lo que significa que casi toda la RX3-GUS se ensambla en estructuras densas (RPBLA).

Una vez que se demostró que la RX3-GUS se acumula en los RPBLA, se recuperó la proteína de fusión de la fracción F56 (tal como se describe en el ejemplo 5 para RX3-hGH) y se solubilizó en Tris 50 mM, pH 8, β -ME al 2% y SDS al 0,1% a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, el material solubilizado se centrifugó a 16000 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se dializó el sobrenadante que contenía la proteína de fusión RX3-GUS desensamblada soluble a 4°C frente a una disolución de Tris 50 mM, pH 8 durante la noche (aproximadamente 18 horas).

La prueba de actividad GUS se basa en la catálisis del ácido metilumbeliferil- β -glucurónido (MUG) para dar el producto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU), mediante la enzima GUS (Jefferson *et al.* 1987 EMBO J. 6(13):3901-3907). Se incubaron cincuenta μ l de la proteína de fusión RX3-GUS solubilizada (aproximadamente 0,25 ng de RX3-GUS/ μ l) en presencia de MUG a temperatura ambiente, y se llevó a cabo la aparición de 4-MU en un fluorímetro (longitud de onda de excitación 355 nm; longitud de onda de emisión 420 nm). Para descartar la posibilidad de medir actividad de tipo GUS endógena presente en la preparación de RPBLA a partir de las células CHO, se aislaron los RPBLA a partir de células CHO transfectadas con p3.1-RX3, y una vez que se solubilizó la proteína RX3, se incluyó esta muestra en la prueba de actividad como control. La tabla siguiente resume los resultados obtenidos:

Absorbancia a 420 nm

Tiempo (minutos)	RX3-GUS		RX3	
	Media	DE	Media	DE
0	337	24	227	6,4
30	534	4,2	236	15
60	690	12,7	265	9,2
90	909	30,4	299	21,2
120	1049	38,9	309	10,6
160	1141	21,9	311	82

A partir de los resultados mostrados en esta tabla, queda claro que la proteína de fusión RX3-GUS permanece activa una vez solubilizada a partir de los RPBLA. La actividad específica de la RX3-GUS calculada a partir de estos experimentos fue de 0,2 pmol de 4-MU/min-1 * 12,5 ng-1 de RX3-GUS. No se observó actividad de tipo GUS endógena significativa cuando se analizó la preparación de RX3.

Ejemplo 9: Actividad de RX3-EK ensamblada en los RPBLA en células CHO

La enterocinasa de *Bos taurus* (enteropeptidasa) es una serina proteasa unida a la membrana de la mucosa duodenal, implicada en el procesamiento del tripsinógeno en tripsina (DDDK↓) con un dominio de serina proteasa de tipo quimotripsina. La enteropeptidasa es un péptido bicatenario con enlaces disulfuro formado por la cadena pesada (EK_{HC} – 120 kD) y la cadena ligera catalítica (EK_{LC} – 47 kD). La subunidad catalítica (denominada en el presente documento como EK) es casi tan activa y específica por sí misma como la totalidad de la holoenzima (LaVallie *et al.* 1993 J. Biol. Chem. 268(31):23311-23317). Es importante señalar que la EK bovina tiene 4 enlaces disulfuro. Además, el extremo N-terminal de la proteína se pliega dentro de la proteína, y es esencial para el plegamiento apropiado de una EK funcional. Estos dos requisitos de la EK hacen que la proteína EK constituya un reto en cuanto a la expresión de la proteína como una proteína activa en los RPBLA.

La secuencia de polinucleótido que codifica para RX3 (documento WO2004003207) se fusionó a través de un enlazador que comprende el sitio de escisión FXa (IEGR) al extremo 5' de la secuencia de EK, y se clonó en pcDNA3.1(-) (figura 1A, p3.1-RX3-EK).

Esta construcción se usó en la transfección de células CHO mediante el método de Lipofectamina (Invitrogen). El análisis de inmunoquímica de aquellas células transfectadas con antisuero anti-RX3 reveló la presencia de una gran cantidad de RPBLA pequeños. Estos orgánulos iban a verse a lo largo de todo el citoplasma de las células transfectadas, pero el tamaño normalmente no superó los 0,5 micrómetros (figura 5F).

Para verificar la densidad de esos RPBLA pequeños, se homogeneizaron células CHO transfectadas con el mismo plásmido y se cargaron en gradientes escalonados de densidad. La proteína de fusión RX3-EK se localizó en la fracción F56 (figura 2B). La alta densidad de los ensamblajes de la proteína de fusión RX3-EK sugiere que esta proteína de fusión se acumula en los RPBLA densos. Es importante observar que no se detectó proteína de fusión en el sobrenadante, lo que significa que casi toda la RX3-EK se ensambla en estructuras densas (RPBLA). De manera interesante, se estimó que el peso molecular de la proteína de fusión RX3-EK era de 58 KDa, aproximadamente 15 KDa mayor que el peso molecular teórico. Este resultado sugiere que la EK en los RPBLA está altamente glicosilada, tal como se ha descrito para la proteína natural (LaVallie *et al.*, 1993 J. Biol. Chem. 268(31):23311-23317).

La proteína de fusión se recuperó de la fracción F56 (tal como se describe en el ejemplo 5 para RX3-hGH) y se solubilizó en Tris 50 mM, pH 8, β-ME al 2% y SDS al 0,1% a 37°C durante 2 horas. Para aumentar la solubilización, la muestra se sonicó a una amplitud del 50% y ciclo del 50% durante 1 minuto, repetido 5 veces (Ikasonic U200S – IKA Labortechnik), antes de que se añadiera el SDS. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 5000 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos, y el sobrenadante que contenía la proteína de fusión RX3-EK desensamblada soluble se dializó a 4°C frente a una disolución de Tris 50 mM, pH 8 durante la noche (aproximadamente 18 horas). Entonces, la proteína de fusión se digirió mediante FXa tal como se describe por el fabricante (Quiagen), y se midió la actividad EK mediante ensayo fluorimétrico (Grant, *et al.*, 1979 Biochim. Biophys. Acta 567:207–215). La EK liberada de la RX3-EK tenía actividad enteropeptidasa.

Ejemplo 10: Actividad de RX3-Casp2 y RX3-Casp3 ensambladas en los RPBLA en células CHO

Se emprendieron estudios para determinar la actividad de caspasas producida en los RPBLA.

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que escinden con alta especificidad tras un ácido aspártico de una secuencia consenso. Son los principales ejecutores del proceso altamente regulado de la apoptosis.

Las caspasas existen como procaspasas inactivas con un prodominio de longitud variable seguido por una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Se activan a través de proteólisis y la caspasa activa madura consiste en el heterotetrámero p20₂-p10₂ (Lavrik *et al.*, 2005 J. Clin. Invest. 115:2665-2671). Las caspasas se dividen en caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras que difieren en su mecanismo de acción. La caspasa 2 (caspasa iniciadora) y la caspasa 3 (caspasa ejecutora) se han elegido como ejemplo de proteínas que son activas en los RPBLA (Baliga *et al.*, 2004 Cell Death and Differentiation 11:1234-1241; Feeney *et al.*, 2006 Protein Expression and Purification 47(1):311-318). Esas proteínas representan un reto especialmente porque se sintetizan como zimógenos que, para volverse activos, es necesario que se autoescindan y formen el heterotetrámero.

Las construcciones p3.1-RX3-C2 y p3.1-RX3-C3 (figura 1) se introdujeron en células CHO mediante transfección transitoria con el protocolo de Lipofectamina (Invitrogen). Cuatro días después de la transfección, para determinar si se acumulan caspasas en los orgánulos de los RPBLA densos, se homogeneizaron células CHO que expresaban RX3-Casp2 o RX3-Casp3, se cargaron en un gradiente escalonado de densidad y se centrifugó tal como se describe en otra parte.

La acumulación de ambas proteínas de fusión de RX3-caspasas en las diferentes fracciones se analizó mediante inmunotransferencia (figura 2B). Tal como puede observarse, la mayor parte de las proteínas de fusión RX3-Casp2 o RX3-Casp3 sedimentan en las fracciones F56 y F42 que corresponden a RPBLA densos. Este resultado indica que estas dos proteínas de fusión pueden ensamblarse fuertemente en estructuras densas.

En la inmunotransferencia presentada en la figura 2B, sólo se mostró la proteína de fusión de longitud, pero están presentes bandas de diferente peso molecular en esta fracción. Estas bandas que son reactivas o bien al anticuerpo anti-RX3 o bien al anticuerpo anti-CASP (SA-320 y SA-325, Biomol International) corresponden a las diferentes subunidades de caspasa, lo que indica que ha tenido lugar una activación autocatalítica dentro de los RPBLA. Estas observaciones indican que la caspasa 2 y la caspasa 3 son activas *in vivo*.

Se diluyeron las fracciones F56 y F42 4 veces en tampón PBP4 y se centrifugaron a 80000 x g en un rotor oscilante para recuperar los RPBLA en el sedimento. La membrana de RE que rodea este orgánulo se eliminó mediante lavado de la preparación de los RPBLA con Tris 50 mM, pH 8 y Triton X-100 al 1%. Con la eliminación de la membrana de RE, se sometió a ensayo la actividad de caspasa usando el sistema de ensayo BIOMOL QuantiZyme™, kit de ensayo de la actividad celular de caspasa 3 PLUS-AK703 (caspasa 3) y el sistema de ensayo BIOMOL QuantiZyme™, kit de ensayo de la actividad celular de caspasa 2 PLUS-AK702 (caspasa 2). Este kit mide la actividad caspasa colorimétricamente con un sustrato específico. Los RPBLA de la RX3-Casp2 y la RX3-Casp3 muestran actividad caspasa.

En la determinación de la actividad de caspasas fusionadas a RX3, la proteína de fusión se solubiliza de los RPBLA aislados mediante gradiente de densidad (F56 y F42, diluidas 4 veces en tampón PBP4 y centrifugadas a 80000 x g en un rotor oscilante). La proteína de fusión se solubiliza en tampón CA (Hepes 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 100 mM, CHAPS al 1%, glicerol al 10%) tras sonicación (amplitud del 50% y ciclo del 50% durante 30 segundos, 5 veces). Se realiza la solubilización mediante una incubación de 2 horas a 37°C y se desecha el material insoluble mediante centrifugación a 16000 x g durante 10 minutos. Se dializa el sobrenadante que contiene la proteína de fusión RX3-casp soluble frente al tampón de ensayo del kit de caspasa (Hepes 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, CHAPS al 0,1%, glicerol al 10%). Se evalúa la actividad de la muestra dializada que contiene RX3-Casp2 y RX3-Casp3 con el sistema de ensayo BIOMOL QuantiZyme™, kit de ensayo de la actividad celular de caspasa 3 PLUS-AK703 (caspasa 3) y el sistema de ensayo BIOMOL QuantiZyme™, kit de ensayo de la actividad celular de caspasa 2 PLUS-AK702 (caspasa 2). La caspasa 2 y la caspasa 3 son activas.

Ejemplo 11: Actividad de RX3-RTB ensamblada en los RPBLA en plantas de tabaco agroinfiltradas

La secuencia de polinucleótido que codifica para RTB (Reed *et al.*, 2005 Plant Cell Report 24:15-24) se fusionó en el mismo marco de lectura al extremo 3' del dominio RX3 y se clonó en un vector binario (pB-RX3-RTB).

Esta construcción se usó en plantas de tabaco transformadas mediante agroinfiltración con jeringa, tal como se describe en otra parte. Las hojas de tabaco agroinfiltradas se homogeneizaron y se cargaron en gradientes escalonados de densidad. La proteína de fusión RX3-RTB se localizó en las fracciones F42 y F56 (figura 2B), lo que sugiere que la proteína de fusión se autoensambla y se acumula en los RPBLA densos. Tal como se describe para RX3-EK, la proteína de fusión RX3-RTB aislada a partir de los RPBLA tiene una movilidad electroforética menor en comparación con el peso molecular teórico. Este resultado respalda que RTB puede estar glicosilado en los RPBLA.

La proteína de fusión se recuperó de aquellas fracciones densas (tal como se describe en el ejemplo 5 para RX3-hGH) y se solubilizó en Tris 50 mM, pH 8, β-ME al 0,8% a 37°C durante 2 horas. Para aumentar la solubilización, la muestra se sonicó a una amplitud del 50% y ciclo del 50% durante 1 minuto, repetido 5 veces (Ikasonic U200S – IKA Labortechnik). Posteriormente, se centrifugó la muestra a 5000 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos, y el sobrenadante que contenía la RX3-RTB desensamblada soluble se analizó mediante ELISA para determinar la

unión a la glicoproteína fetuina tratada con sialidasa para exponer glicanos terminados en galactosa. La RX3-RTB se une a ella.

Ejemplo 12: Construcción de plásmido para transformación de plantas

5 Las secuencias codificantes del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) se obtuvieron sintéticamente y se modificaron con el fin de optimizar su utilización de codones para la expresión en plantas.

Proteína hEGF (SEQ ID NO:41)

10 ADN de hEGF (SEQ ID NO:42)

Se obtuvo el gen sintético que codifica los 53 aminoácidos de hEGF activo mediante el método de PCR de extensión por solapamiento de cebadores, usando 4 oligonucleótidos de aproximadamente 60 bases, con 20 bases solapantes. El ADNc de hEGF sintético incluía una secuencia enlazadora en 5' correspondiente al sitio de escisión específico del factor Xa. Se purificaron los oligonucleótidos mediante gel desnaturante de poliacrilamida.

Se purificó ADNc de hEGF sintético a partir de gel de agarosa (Amersham) y se clonó en el vector pGEM (Promega). El fragmento de ADNc de RX3 (que codifica para un dominio N-terminal de gamma-zeína) que contiene extremos cohesivos de BspHI y NcoI, se insertó en el vector pCKGFPS65C (Reichel *et al.*, 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5888-5893) digerido previamente con NcoI (tal como se describe en la solicitud de patente WO2004003207). La secuencia que codifica para EGF se fusionó en el mismo marco de lectura a la secuencia RX3. Las construcciones RX3-EGF se prepararon mediante sustitución de la secuencia codificante de GFP por el gen sintético de EGF.

La construcción resultante denominada pCRX3EGF contenía una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de una proteína como el promotor 35S potenciado, un potenciador de traducción como el virus del grabado del tabaco (VGT), la secuencia codificante de EGF y las secuencias poliadenilación en 3' del virus del mosaico de la coliflor (VMC). En última instancia, se obtuvo el vector de transformación de plantas eficaz p19RX3EGF mediante la inserción de los casetes de expresión HindIII/HindIII en el vector binario pBin19 (Bevan, 1984 Nucleic Acids Research 12:8711-8721).

El ADNc que codifica para la alfa-zeína de 22 kD (22aZ) y la prolamina de arroz de 13 kD (rP13) se amplificaron mediante RT-PCR a partir de una genoteca de ADNc de cultivar de arroz Senia y maíz W64A, respectivamente. Los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR fueron:

35 22aZ-5' (SEQ ID NO:43)

22aZ-3' (SEQ ID NO:44)

Rice13Prol-5' (SEQ ID NO:45)

Rice13Prol-3' (SEQ ID NO:46)

40 Se clonaron los correspondientes fragmentos de PCR en el vector pCRII (Invitrogen), se secuenciaron y se clonaron en vectores pUC18 que contienen el promotor 35S de VMC potenciado, la secuencia TEV y el terminador ocs en 3'. El pCRII-rP13 se digirió mediante Sall y NcoI, y se clonó en los plásmidos pUC18RX3Ct, pUC18RX3hGH y pUC18RX3EGF digeridos mediante las mismas enzimas para obtener el plásmido pUC18rP13EGF. El pCRII-22aZ se digirió mediante Sall/NcoI y se clonó en el plásmido pUC18RX3EGF digerido mediante las mismas enzimas para obtener el plásmido pUC1822aZtEGF. Finalmente, se clonó el vector derivado de pUC18 en pCambia 5300 mediante HindIII/EcoRI.

La construcción pBIN m-gfp4-ER, contiene una GFP optimizada para la expresión en plantas (Haseloff *et al.*, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2122-2127). Esta construcción se usó como molde para la amplificación por PCR de la GFP. Los oligonucleótidos se diseñaron para eliminar el péptido señal y el motivo HDEL presente en la secuencia original así como para introducir los sitios de restricción para la clonación adicional.

Cebadores:

GFP 5' (SEQ ID NO:50)

55 GFP 3' (SEQ ID NO:51)

El producto de PCR se clonó en un vector de clonación de PCR (vector PCR[®]II, Invitrogen)) y se verificó la secuencia. Se clonó el fragmento de GFP que contiene extremos cohesivos RcaI/BamHI en pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)), proporcionando el casete RX3-GFP en un vector pUC18. Este casete se liberó mediante digestión con HindIII/BamHI y posteriormente se insertó en un vector pCambia 2300 (pB-RX3-GFP)

Se amplificó el clon RTB (nº de registro en GenBank X03179) mediante PCR (RTB5 y RTB3) y se digirió mediante RcaI/SmaI. El fragmento de PCR digerido se clonó en pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)) digerido mediante NcoI/SmaI para obtener pUC18RX3RTB. Entonces, este vector se digirió mediante HindIII/EcoRI y se

clonó el fragmento liberado en un vector pCAMBIA 2300 digerido mediante las mismas enzimas de restricción (pB-RX3-RTB)

Cebadores:

5 RTB5 (SEQ ID NO:52)

RTB3 (SEQ ID NO:53)

Material vegetal

10 Se hicieron crecer plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin) en una cámara de crecimiento *in vitro* a 24-26°C con un fotoperiodo de 16 horas. Se hicieron crecer las plantas adultas en invernadero a entre 18-28°C, se mantuvo la humedad entre el 55 y 65% con un fotoperiodo promedio de 16 horas.

15 Se hicieron crecer plántulas para el método de agroinfiltración (Vaquero *et al.*, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 96(20):11128-11133; Kapila *et al.*, 1997 Plant Sci. 122:101-108) a partir de semillas durante 4-6 semanas en las condiciones *in vitro* descritas anteriormente.

Transformación estable de tabaco

20 Se transfirieron los vectores binarios a la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Se transformaron discos de hoja de tabaco (*Nicotiana tobacum*, W38) tal como describen Draper y Hamil 1988, En: Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual (Eds. Draper, J., Scott, R., Armitage, P. y Walden, R.), Blackwell Scientific Publications. Se seleccionaron las plantas regeneradas sobre medio que contenía kanamicina 200 mg/l y se transfirieron a un invernadero. Se cultivaron plantas de tabaco transgénicas que tenían los mayores niveles de producto transgénico con el fin de obtener las generaciones T1 y T2.

30 Se detectaron los niveles de proteína recombinante mediante inmunotransferencia. Se cuantificaron extractos de proteína total procedentes de las hojas de tabaco mediante el ensayo de Bradford, se separaron sobre SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando una celda de transferencia electroforética Mini Trans-Blot (Bio Rad). Se incubaron las membranas con antisuero contra gamma-zeína (dilución 1/7000) (Ludevid *et al.* 1985, Plant Science 41:41-48) y entonces se incubaron con anticuerpos conjugados con peroxidasa del rábano (dilución 1/10000, Amersham Pharmacia). Se detectaron bandas inmunoreactivas mediante quimioluminiscencia potenciada (sistema de inmunotransferencia de tipo Western con ECL, Amersham Pharmacia).

35 Agroinfiltración de tabaco

Agroinfiltración al vacío

40 Se hicieron crecer plántulas para el método de agroinfiltración a partir de semillas durante 4-6 semanas en una cámara de crecimiento *in vitro* a 24-26°C con un fotoperiodo de 16 hora

45 Se hizo crecer la cepa LB4404 de *A. tumefaciens* que contenía una construcción deseada sobre medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levaduras 5 g/l, NaCl 10 g/l) complementado con kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (100 mg/l) a 28°C con agitación (250 rpm) durante la noche (aproximadamente 18 horas). Entonces se inocularon las agrobacterias en 30 ml de LB también complementado con kanamicina (50 mg/l) y rifampicina (100 mg/l). Tras el cultivo durante la noche a 28°C (aproximadamente 18 horas), se recogieron las células agrobacterianas mediante centrifugación durante 10 minutos a 3000 x g y se resuspendieron en 10 ml de medio MS líquido con MES (Sigma Chemical) 4,9 g/l y sacarosa 30 g/l a pH 5,8. Se ajustó el cultivo bacteriano hasta una DO₆₀₀ final de 0,1 para agroinfiltración. Entonces, se complementó el cultivo celular con acetosiringona hasta una concentración final de 0,2 mM y se incubó durante 90 minutos a 28°C.

55 Para la agroinfiltración, las plántulas se cubrieron totalmente con la suspensión y se aplicó vacío (100 KPa) durante 5-6 segundos. Se retiró la suspensión y se mantuvieron las plántulas en una cámara de crecimiento a 24-26°C con un fotoperiodo de 16 horas durante cuatro días. Se recuperó el material vegetal y se analizó la extracción de proteína total mediante inmunotransferencia usando anticuerpo anti-gamma-zeína.

Agroinfiltración mediante jeringa

60 Se hizo crecer la cepa EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* a 28°C en medio L complementado con kanamicina 50 µg ml⁻¹ y rifampicina 50 µg ml⁻¹ hasta la fase estacionaria. Se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en tampón MES 10 mM, pH 5,6, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 200 µM hasta una DO₆₀₀ final de 0,2. Se dejaron las células en este medio durante 3 h a temperatura ambiente. Se mezclaron entre sí los cultivos individuales de *Agrobacterium* que llevaban las construcciones de RX3 y las construcciones del supresor de silenciamiento HC-PRO (Goytia *et al.*, 2006) y se

infiltraron en la cara abaxial de hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de 2-4 semanas de edad (Voinnet *et al.*, 2003).

Ejemplo 13: Aislamiento (purificación) de RPBLA mediante gradiente de densidad a partir de tejidos vegetativos de plantas transgénicas

El gen que codifica proteínas de fusión derivadas de gamma-zeína RX3-EGF se introdujo en plantas de tabaco a través de *Agrobacterium tumefaciens*. Se analizaron las plantas transformadas mediante inmunotransferencia para determinar aquellas plantas con mayor expresión de proteína recombinante. Las bandas inferiores predominantes de las inmunotransferencias corresponden a la forma monomérica de las proteínas de fusión y las bandas superiores a los dímeros. Las proteínas de fusión normalmente se acumulan como multímeros y la cantidad de monómeros y oligómeros detectados en las inmunotransferencias depende del nivel de reducción de los enlaces disulfuro.

Se cargaron extractos de hoja de tabaco en gradientes escalonados de densidad y se analizó la acumulación de proteínas recombinantes en las diferentes fracciones mediante inmunotransferencia. Los resultados indican que RX3-EGF apareció en las fracciones que corresponden a RPBLA densos. La mayor parte de estos orgánulos mostró densidades superiores a 1,2632 g/cm³ y una parte significativa de ellos mostró una densidad superior a 1,3163 g/cm³.

Estos RPBLA novedosos formados en hojas de tabaco muestran densidades en el intervalo de los cuerpos proteicos del maíz natural (Ludevid *et al.*, 1984 Plant Mol. Biol. 3:227-234; Lending *et al.*, 1989 Plant Cell 1:1011-1023), o son incluso más densos.

Se estimó que más del 90 por ciento de la proteína recombinante se recuperó en las fracciones de RPBLA densos y el sedimento. Por tanto, el aislamiento de los RPBLA por densidad parece ser un sistema útil para purificar (concentrar) las proteínas de fusión.

Para evaluar la purificación de la proteína recombinante RX3-EGF mediante el aislamiento de los RPBLA, se analizaron las diferentes fracciones de densidad mediante tinción con plata. Más del 90 por ciento de las proteínas endógenas del tabaco se localizaron en las fracciones soluble y de la interfase del gradiente, las fracciones en las que la proteína RX3-EGF estaba ausente o apenas se detectó. Por tanto, las proteínas solubles y gran parte de las proteínas presentes en orgánulos menos densos pudieron desecharse seleccionando una o dos fracciones del gradiente.

Con respecto al grado de purificación de las proteínas de fusión en las fracciones de los RPBLA, se estimó que la proteína RX3-EGF representa aproximadamente el 80 por ciento de las proteínas detectadas en las fracciones que contienen PBLs. Este resultado indica que, usando un procedimiento de aislamiento de RPBLA, puede lograrse un importante enriquecimiento de las proteínas de fusión sólo en una etapa de purificación.

Ejemplo 14: Recuperación de proteínas recombinantes en los RPBLA aislados a partir de tejidos vegetales secos

Un punto importante en el cultivo molecular es la presencia de un medio sencillo para almacenar biomasa vegetal. En este contexto, el secado puede proporcionar un método conveniente para disminuir el volumen de almacenamiento y conservar el producto. No obstante, frecuentemente el secado promueve la degradación de las proteínas de interés. El uso de plantas desecadas para aislar RPBLA que contienen proteínas recombinantes sería de gran interés para fines industriales.

Se secaron hojas de tabaco transformadas que acumulaban la proteína de fusión RX3-EGF tal como se describió anteriormente, como se trató también anteriormente. Tras 5 meses de almacenamiento en seco, se analizó la estabilidad de las proteínas recombinantes. Se analizaron extractos de proteína a partir de cantidades equivalentes de tejido de la hoja húmedo (fresco) y seco mediante inmunotransferencia. La proteína RX3-EGF era estable en plantas transformadas desecadas, siendo similar la cantidad recuperada en plantas húmedas y secas.

La distribución en gradientes escalonados de densidad de la proteína de fusión RX3EGF a partir de homogeneizados de hojas desecadas se analizó mediante inmunotransferencia. La proteína de fusión se recuperó principalmente en estructuras densas que mostraban densidades superiores a 1,1868 g/cm³ y 1,2632 g/cm³.

Por tanto, las proteínas recombinantes pueden purificarse a partir de tejidos desecados a través del aislamiento de RPBLA, ilustrando así que la recogida de las plantas transgénicas y la extracción de proteínas recombinantes pueden ser independientes en el tiempo. En línea con estos resultados, las proteínas de fusión de gamma-zeína también se acumularon en los RPBLA en semillas de arroz.

Ejemplo 15: Recuperación de proteína recombinante mediante aislamiento de RPBLA a partir de plántulas de tabaco transformadas de manera transitoria

Los sistemas de expresión transitoria pueden ser una herramienta conveniente para someter a prueba el comportamiento de acumulación de las proteínas recombinantes en un corto periodo de tiempo. Por tanto, la proteína recombinante RX3-EGF también se expresó y acumuló en plántulas de tabaco transformadas de manera transitoria mediante agroinfiltración. Los extractos de proteína procedentes de plántulas transformadas analizadas mediante inmunotransferencia muestran el patrón electroforético complejo característico observado a partir de plantas transformadas de manera estable, lo que indica que las proteínas de fusión se ensamblan correctamente usando este método de transformación.

Ejemplo 16: Recuperación de proteínas recombinantes mediante centrifugación a baja y media velocidad

Para simplificar el procedimiento usado para purificar las proteínas recombinantes mediante productos ensamblados de tipo cuerpo proteico recombinante densos, se realizaron dos métodos alternativos adicionales: i) se centrifugaron homogeneizados clarificados a través de sólo un colchón de sacarosa densa y ii) simplemente se centrifugaron los homogeneizados clarificados con centrifugación a baja velocidad (es decir 1000-2500 x g durante 10 minutos).

De acuerdo con los resultados descritos previamente, la proteína RX3-EGF se recuperó con altos rendimientos (superiores al 90%) en los sedimentos obtenidos tras la centrifugación a través de colchones de sacarosa de 1,1868 g/cm³. Además, la purificación de la proteína RX3-EGF fue muy alta porque apenas se detectaron proteínas endógenas de tabaco en el correspondiente sedimento.

La principal ventaja de este método en comparación con los gradientes escalonados de densidad reside en su fácil modificación a escala para la producción industrial de proteínas recombinantes. Debe observarse que pueden ajustarse la densidad del colchón así como otras propiedades, tales como su viscosidad y osmolaridad, en cada caso con el fin de optimizar la recuperación y purificación de las proteínas recombinantes.

Además, también se sometió a ensayo la centrifugación a baja velocidad (CBV) para concentrar y purificar las estructuras de tipo cuerpo proteico que contienen proteína de fusión. Los resultados indicaron que, tras 1000 x g durante 10 minutos, prácticamente toda la proteína de fusión RX3-EGF se recuperó en el sedimento. Pero la tinción de las proteínas contenidas en este sedimento reveló que la proteína de fusión no estaba altamente purificada en comparación con la obtenida tras la centrifugación a través de una capa de sacarosa de 1,1868 g/cm³.

Posteriormente, se lavó el primer sedimento obtenido mediante centrifugación a baja velocidad usando un tampón que contenía Triton® X-100 al 5%. Tras el lavado, se centrifugó la muestra a 12,000 x g durante 5 minutos y, de manera interesante, gran parte de las proteínas contaminantes presentes en el sedimento P1 se eliminaron tras el lavado y la centrifugación y el nuevo sedimento contenía una proteína RX3-EGF altamente enriquecida. Se observa que la cantidad así como el patrón de las proteínas observadas en este estudio son similares a los obtenidos tras el lavado del sedimento obtenido tras la centrifugación a través de la capa de sacarosa en el tampón que contiene Triton X-100. La alternativa de centrifugación a baja velocidad se basa en la alta densidad de las estructuras que contienen proteínas de fusión y pueden optimizarse las condiciones de centrifugación para cada diana antes de ampliar a escala.

Se produjeron plantas de tabaco transgénicas que expresaban proteínas de fusión que incluían EGF unido a prolamina de arroz o alfa-zeína en lugar de RX3, rP13-EGF y la 22aZ-EGF, mediante transformación en *Agrobacterium tumefaciens*. Se determinaron las de mejor expresión mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo contra el EGF, y se usaron esas líneas celulares en un análisis comparativo con plántulas de tabaco agroinfiltradas con las mismas construcciones. En todos los casos, se recuperaron los RPBLA en la interfase única, lo que sugiere que los RPBLA son muy densos y homogéneos.

Tomando todos estos resultados en conjunto, queda claro que las prolaminas pueden inducir RPBLA de alta densidad, incluso cuando se fusionan a otras proteínas. Esto es un resultado inesperado, principalmente cuando casi no se observa homología entre ellas. Además, hay algunos datos que sugieren que las prolaminas interaccionan para estabilizar los corpúsculos de proteína, y que algunas de ellas no son estables cuando se expresan en tejido vegetativo solo, como por ejemplo la alfa-zeína (Coleman *et al.*, 1996 Plant Cell 8:2335-2345)

Ejemplo 17: Extracción de proteínas recombinantes a partir de RPBLA aislados

Se ha demostrado que el aislamiento de productos ensamblados de tipo PB recombinantes densos es un método ventajoso para recuperar proteínas recombinantes con alto rendimiento y alto nivel de purificación a partir de organismos transgénicos. En este caso, se muestra que estas proteínas recombinantes pueden extraerse de los orgánulos de reserva.

Tras una incubación durante la noche (aproximadamente 18 horas) de fracciones de RPBLA a 37°C en un tampón que contiene un detergente y agentes reductores (tampón SB que contenía borato de sodio 12,5 mM, pH 8, SDS al 0,1% y β-mercaptoetanol al 2%; tratamiento), se solubilizó la proteína RX3-EGF. Se recuperó la proteína de fusión extraída en su forma soluble. Posteriormente, como una función de su aplicación, las proteínas extraídas pueden someterse a purificación adicional o usarse como extractos parcialmente purificados.

Ejemplo 18: Construcción de plásmido para transformación de células animales

Se amplificó la secuencia RX3 mediante PCR para obtener los fragmentos de ADNc correspondientes a RX3 y RX3-(Gly)₅. Estos fragmentos se digirieron mediante Sall/BamHI, se clonaron en el plásmido pECFP-N1 (Clontech) abierto mediante las mismas enzimas para obtener los plásmidos pRX3-ECFP y pRX3-G-ECFP, respectivamente.

Cebadores:

SPfor (SEQ ID NO:54)

RX3ECFP3' (SEQ ID NO:55)

RX3G5ECFP3' (SEQ ID NO:56)

El vector p22aZ-ECFP corresponde al siguiente fragmento de ADN HindIII/XbaI en el plásmido pEGFP-N1 (Clontech) (SEQ ID NO:57)

La GFP se obtuvo mediante amplificación por PCR del plásmido pEGFP-N1 (Clontech) con oligonucleótidos específicos que contienen sitios de restricción de enzimas para la clonación adicional:

ECFP NcoI 5' (SEQ ID NO:58)

ECFPN1 BamNotSac 3' (SEQ ID NO:59)

El producto de PCR (GFP) se clonó en un vector de clonación de PCR (vector PCR®II, Invitrogen) y se verificó la secuencia. Se escindió el fragmento de GFP mediante digestión con NcoI/BamHI y se clonó en pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)), proporcionando el casete RX3-GFP en un vector pUC18. Este casete se liberó mediante digestión con Sall/BamHI y posteriormente se clonó en un pCDNA3.1(-) (Invitrogen) digerido previamente mediante XhoI/BamHI (p3.1-RX3-GFP)

Una construcción que contenía la secuencia codificante de una proteína DS Red monomérica mejorada (mCherry; Shaner *et al.*, 2004 Nat. Biotechnol. 22:1567-1572) fue un molde en una reacción de PCR (mCherry RcaI 5'/ECFPN1 BamNotSac 3').

mCherry RcaI 5' (SEQ ID NO:60)

El producto de PCR (DsRed) se clonó en un vector de clonación de PCR (vector PCR®II, Invitrogen) y se verificó la secuencia. El fragmento DsRed se escindió mediante digestión con RcaI/BamHI y se clonó en pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)), proporcionando el casete RX3-DsRed en un vector pUC18. Este casete se liberó mediante digestión con Sall/BamHI y posteriormente se clonó en un pCDNA3.1(-) (Invitrogen) digerido previamente mediante XhoI/BamHI (p3.1-RX3-DsRED)

Para obtener un ADNc de RX3 ADNc un codón de terminación en el extremo 3', el fragmento RX3 se amplificó mediante PCR (SPFOR/RX3STOP) y se digirió mediante Sall/BamHI. Se clonó el fragmento en pCDNA3.1(-) digerido mediante las mismas enzimas de restricción para obtener p3.1-RX3.

RX3STOP3' (SEQ ID NO:61)

El ADNc que codifica para la hGH se fusionó a la secuencia codificante de gamma-zéína N-terminal RX3 (patente WO2004003207) y se introdujo en el vector pCDNA3.1(-) (Invitrogen) tal como se describe en otra parte. En la construcción resultante denominado p3.1RX3hGH, las secuencias de la proteína de fusión estaban bajo el promotor de VMC y el terminador pA BGH.

La inteína de ADNb de Ssp del plásmido pTWIN1 (New England Biolabs) y el ADNc de hGH se amplificaron mediante PCR. Ambos fragmentos de PCR se fusionaron en el mismo marco de lectura, también mediante PCR, se digirieron mediante NcoI/BamHI y se clonaron en el vector pUC18RX3hGH (documento US2006121573 (A1)) también digerido mediante NcoI/BamHI. El inserto RX3-Int-hGH se obtuvo mediante digestión con Sall/BamHI de este vector intermedio y se clonó en pCDNA3.1(-) (Invitrogen) digerido mediante XhoI/BamHI. La construcción resultante se denominó p3.1-RX3-I-hGH. El producto de PCR se digirió mediante BsRGI/BamHI y se clonó en el plásmido p3.1-RX3-I-hGH digerido con las mismas enzimas de restricción.

Cebadores:

5'DNAb (SEQ ID NO:62)

3'DNAb (SEQ ID NO:63)

DNAb-hGH: (SEQ ID NO:64)

3'hGH (SEQ ID NO:65)

Como control negativo de inducción de escisión, se obtuvo mediante ingeniería un ADNb de SSp no escindible. Se obtuvo inteína de ADNb de Ssp mutada (Asp154 → Ala154) fusionada en el mismo marco de lectura a la hGH mediante PCR a partir de p3.1-RX3-I-hGH.

Cebadores:
IM-for (SEQ ID NO:66)
IM-rev (SEQ ID NO:67)

Se adquirieron ADNc de longitud completa de caspasa 2 (IRAU969A0210D6) y caspasa 3 (IRATp970B0521D6) humanas de RZPD GmbH (Berlín), a partir de una referencia original basada en la Biblioteca Nacional Lawrence Livermore.

Mediante PCR, se añadieron sitios de escisión específicos de la caspasa 3 y la caspasa 2 (DEVD y DEHD, respectivamente) en los extremos 5' de la correspondiente secuencia de caspasa. Es importante observar que el fragmento amplificado correspondiente a caspasa 2 no contenía el pro-dominio.

Casp3 directo (SEQ ID NO:68)
Casp3 inverso (SEQ ID NO:69)
Casp2 directo (SEQ ID NO:70)
Casp2 inverso (SEQ ID NO:71)

Las secuencias amplificadas se clonaron en pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)) mediante digestión con NcoI y KpnI. La construcción resultante se digirió entonces mediante Sall/KpnI y se clonó en un vector pCDNA3.1 (Invitrogen) digerido mediante XhoI/KpnI. Los correspondientes vectores se denominaron (p3.1-RX3-C2 y p3.1-RX3-C3).

El vector pUC18RX3hGH (documento US2006123509 (A1)) se digirió mediante HindIII/EcoRI, y el inserto liberado se clonó en pCambia2300 también digerido mediante estas enzimas. El correspondiente vector se digirió mediante HindIII/NcoI y el inserto se clonó en pCambia1381 abierto mediante HindIII/NcoI (p4-17). Se obtuvo el ADN que comprendía el fragmento RX3-(gly)x5-GUS mediante digestión de p4-17 mediante BstEII, entonces rellenando la proyección con Klenow y finalmente digiriendo mediante Sall. Este fragmento se clonó en pCDNA3.1(-) digerido mediante XhoI/EcoRV para obtener el clon p3.1-RX3-GUS.

El p3.1-RX3-EK corresponde al siguiente fragmento de ADN NheI/HindIII en pCDNA3.1(-) (Invitrogen) (SEQ ID NO:72)

Ejemplo 19: Construcción de plásmido para la infección de insectos

El fragmento RX3-DsRED de p3.1-RX3-DsRED se digirió mediante XbaI/HindIII y se clonó en pFastBac1 (Invitrogen) digerido también mediante estas dos enzimas con el fin de obtener el vector pF-RX3-DsRED.

Se amplificó el ADNc de DsRED mediante PCR a partir de pF-RX3-DsRED usando los siguientes cebadores:

bGH inverso (SEQ ID NO:73)
bGH inverso2 (SEQ ID NO:74)

Para obtener el vector pF-DsRED, se digirió el fragmento de ADN amplificado por PCR mediante XbaI/HindIII y se clonó en pFastBac1 (Invitrogen) también digerido mediante XbaI/HindIII.

Ejemplo 20: Infección de larvas y células de insecto

Baculovirus y larvas

Se usó el sistema de vector de expresión de baculovirus (pFastBac, Invitrogen), como el vector base para este trabajo. Se produjo el virus recombinante y se amplificó tal como describe el fabricante. Se obtuvieron huevos de falso medidor, *Trichoplusia ni*, de Entopath, Inc. (Easton, PA). Los huevos se eclosionaron según las instrucciones proporcionadas por el fabricante; y se usaron larvas en el cuarto estadio larvario para la infección.

Infección de larvas

Se extendieron diversas cantidades de disolución madre de baculovirus, que consistía en virus recombinante ocluido sobre la dieta larvaria, que se pidió que se preparase previamente en copas de Styrofoam de Entopath, Inc. (Easton, PA). Se cubrieron las copas y se dejaron reposar durante una hora de modo que el virus se absorbiera completamente por los medios. Entonces se colocaron las larvas en el cuarto estadio larvario en las copas (aproximadamente de 10 a 15 larvas por copa), y se invirtieron las copas. Se alimentaron las larvas desde la parte superior (parte inferior de la copa) de modo que cayese la materia fecal sobre la tapa en la que se desechó diariamente. La cantidad de alimento fue suficiente durante al menos 5 días de crecimiento. Se recogieron diariamente de tres a cinco larvas para el análisis de RX3-DsRED y DsRED.

Infección de Sf9*Spodoptera*

Se obtuvieron células Sf9 de Invitrogen (San Diego, CA, EE UU) y se cultivaron tal como se describió anteriormente (O'Reilly *et al.*, 1992) usando medio para insectos de Grace complementado con hidrolizado de lactoalbúmina, hidrolizado de levaduras, L-glutamina, suero bovino fetal inactivado por calor al 10% y disolución de penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco). Se hicieron crecer las células o bien en matraces con agitación (Bellco Glass, Vineland, NJ, EE UU) o bien placas de cultivo tisular de plástico de 100 mm (Falcon). Se produjeron virus recombinantes usando el kit de transfección BaculoGold (PharMingen, San Diego, CA, EE UU). Se aislaron placas de lisis individuales y se amplificaron de dos a cuatro veces para obtener una disolución madre viral de alto título que se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la infección de rutina, se permitieron que células Sf9 en medio de Grace se unieran a la parte inferior de una placa de cultivo de plástico de 100 mm (10^7 células/placa). Tras la incubación durante de 15 min. a 1 h, se añadió una parte de la disolución madre viral y se mantuvieron los cultivos a 27°C en una atmósfera de aire humidificado. Comúnmente, se usaron las células a las 30-36 horas tras la infección.

Ejemplo 21: Preparación de RPBLA a partir de células de mamífero y larvas de insecto**Homogeneización***Células de mamífero*

Se recuperaron las células transfectadas de las placas de cultivo mediante raspado y se suspendieron en el medio B de homogeneización (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl al 0,9%, EDTA 5 mM con inhibidores de proteasas). Se tomó la suspensión celular con una jeringa de 5 ml equipada con una aguja de calibre 23 y se aspiró y se expulsó aproximadamente 30 veces. Se siguió la ruptura celular mediante un microscopio de contraste de fases.

Larvas de insecto

Se homogeneizaron larvas de *Trichoplusia ni* congeladas que expresaban las proteínas RX3-DsRED y DsRED en tampón PBP5 (Hepes 20 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM) mediante Polytron durante 2 minutos a 13500 rpm y mediante Potter durante 5 minutos en hielo a 2000 rpm. Este homogeneizado se centrifugó a 200 g 10 minutos para eliminar la cutícula y los restos tisulares y se cargó el sobrenadante con un gradiente escalonado de densidad.

Aislamiento de los RPBLA por densidad

Se aislaron los RPBLA a partir de las células de mamífero y las larvas de insecto congeladas esencialmente tal como se describió para plantas (gradiente escalonado de densidad o centrifugación a baja velocidad).

Ejemplo 22: Solubilización mediante separación bifásica basada en Triton X-114

Se diluyeron los homogeneizados celulares con PBS y se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento. Se añadieron 2 ml de tampón de solubilización enfriado en hielo (Tris 50 mM, pH 7, Triton X-114 al 5%, TCEP 20 mM, NDSB195 20 mM y $MgCl_2$ 100 mM) al sedimento, y posteriormente 1 ml de PBS que contenía urea 1 M, glicerol al 10% y $MgCl_2$ 100 mM.

Esta composición se incubó en hielo durante 15 minutos con agitación en vórtex ocasional. Entonces se sonicó la suspensión durante 20 segundos X 4 a potencial del 50%, manteniéndola en hielo entre ráfagas durante 1 minuto para mantener la temperatura fría. Entonces se incubó la suspensión a 37°C durante 15 minutos para formar las 2 fases. Se añadieron tres mililitros de PEG al 10% a la fase hidrófoba inferior (rica en Triton X-114) y se incubó la composición en hielo durante 20 minutos. Entonces, se incubó la disolución a 37°C durante 15 minutos para formar las 2 fases de nuevo. Se recuperó la fase superior (4 ml) y se guardó para su análisis.

Ejemplo 23: Inmunolocalización

Inmunocitoquímica usando un microscopio de fluorescencia (microscopio Vertical Eclipse Nikon E600A). De 2 a 4 días tras la transfección, se fijaron las células durante 30 minutos en disolución de paraformaldehído al 1% y tras lavar con solución salina tamponada con fosfato, se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo contra: (i) hGH (dilución 1/150), (ii) EK (dilución 1/500), (iii) RX3 (dilución 1/700). Con el fin de detectar la reacción antígeno-anticuerpo, una incubación durante 45 minutos con anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Se realizaron análisis confocales en microscopio láser de barrido confocal (Leica TCS SP, Heidelberg, Alemania) equipado con espectrofotómetros para la selección de la longitud de onda de la banda de emisión. Se recogieron imágenes fluorescentes verdes a una excitación de 488 nm con el láser de ion argón usando un ajuste de la ventana

de emisión a 495-535 nm. Se recogieron imágenes fluorescentes rojas tras la excitación a 543 nm con un láser de HeNe y una ventana de emisión de 550-600. Las secciones ópticas eran de 0,5 a 1 μ m de espesor.

Ejemplo 24: Ensayos de actividad

Ensayo de actividad de EGF

Se sembraron células MDA-MB231 (células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor de EGF) en placas de 96 pocillos a 5.500 células/pocillo. Se permitió que las células se adhirieran durante 8 horas en medio de crecimiento con SFT (suero fetal de ternera) al 10% y entonces se sometieron a condiciones de privación durante la noche en medio complementado con un 0,1% de SFT. Posteriormente, se retira el medio y se añade el EGF (control positivo) de Promega o la muestra correspondiente (RX3-EGF solubilizada) a diferentes concentraciones. Después, se añade la timidina radioactiva a una concentración final de 0,5 μ Ci. Se estudia la proliferación a las 48 horas tras la estimulación a 37°C. Después, se lavan las células dos veces con PBS frío, y se mantienen en hielo las células para detener el metabolismo celular. Se añade una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, y se incuban las células durante 20 minutos a 4°C. Una vez que se elimina la disolución de TCA, se lavan las placas dos veces con etanol al 70%, y se incuban las células durante 20 minutos a 37°C en 0,5 ml de la disolución de lisis (CO_3Na_2 al 2%, NaOH 0,1 N y SDS al 10%). Se mezclan las placas mediante agitación en vortex y no se mide la muestra antes de 12 horas para evitar fenómenos de quimioluminiscencia no deseados.

Ensayo de actividad EK

Se midió la actividad enzimática mediante el ensayo fluorométrico (Grant *et al.* (1979) Biochim. Biophys. Acta 567:207–215). Se inició la reacción mediante la adición de la enzima a de 0,3 a 1,0 mM del sustrato fluorogénico Gly-(Asp)4-Lys- β -naftilamida (Sigma) en Tris-HCl 25 mM (pH 8,4), CaCl_2 10 mM, DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% a 37°C. Se determinó la concentración de β -naftilamina libre a partir del incremento de la fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm) monitorizado de manera continua durante 1 min. Se calculó la actividad como el cambio en la fluorescencia con el tiempo.

Ensayo de actividad GUS

El ensayo de actividad GUS se basa en la catálisis del ácido metilumbeliferil- β -glucurónido (MUG) en el producto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU), por la enzima GUS (Jefferson RA, *et al.* (1987) EMBO J. 6(13): 3901–3907). Se añadieron 50 μ l de RX3-GUS solubilizada (o RX3 solubilizada como control) a 200 μ l de tampón de reacción (50 mM de tampón fosfato pH 7, EDTA 10 mM, SDS al 0,1% y Triton X100 al 0,1%) más 66 μ l de metanol. Se añadió el sustrato (MUG) hasta una concentración final de 10 mM. Se preparó el patrón mediante la adición de 0, 50, 100, 200, 300 ó 500 pmoles de 4-MU (el producto de la reacción) a 200 μ l de tampón de reacción de la reacción (4-MU).

Se mezclaron las muestras y el patrón y se midieron en un fluorímetro (Victor, Perkin-Elmer) a $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. Se midieron las muestras cada 30 minutos durante 3 horas. Se calculó la actividad específica mediante la fórmula: actividad GUS (pmoles de 4-MU/min-1*mg-1) = $(\lambda_{\text{em}}(T1) - (\lambda_{\text{em}}(T0)) / (k * (T1 - T0))$. "K" = razón (unidades de fluorescencia)/(pmol de 4-MU).

Ensayo de actividad de RTB (ELISA de unión a asialofetuína)

Se determinó la funcionalidad de RX3-RTB en los extractos de proteína de los RPBLA a través de la unión a asialofetuína, la glicoproteína fetuína tratada con sialidasa para exponer los glicanos terminados en galactosa. Se unieron doscientos microlitros de asialofetuína (Sigma) a una concentración de 300 mg/ml en tampón PBS modificado (mPBS) (fosfato de Na 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) a los pocillos de una placa de microtitulación Immulon 4HBX (Fisher, Pittsburg, Pa.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó la disolución de recubrimiento y se bloquearon los pocillos con 200 ml de BSA al 3%, Tween 20 al 0,1% en mPBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras desecharse la disolución de bloqueo, se aplicaron 100 ml de los patrones de RTB y extractos de proteína (véase a continuación) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos tres veces con 200 ml de mPBS, Tween 20 al 0,1%. Se aplicó Ac policlonal de conejo anti-lectina de *R. communis* (RCA60) (Sigma) a 1:4000 en tampón de bloqueo (como anteriormente) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos como anteriormente. Se aplicó anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con AP (Bio-Rad) a una dilución de 1:3000 en tampón de bloqueo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tres veces tal como se describió anteriormente y se aplicaron 100 ml de sustrato pNPP (sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo) (Pierce, Rockford, Ill.). Se detuvo la reacción tras 15 minutos mediante la adición de 50 μ l de NaOH 2 N. Se leyó la absorbancia (A405) en un lector de microplacas Bio-Tek EL808 Ultra. Se prepararon extractos de proteína a una razón de 1 g en PF de hoja con respecto a 3 ml de tampón Tris-ascorbato (anteriormente), y las muestras se compararon frente a una curva patrón que consistía en RTB derivada de semilla de ricino diluida en serie (Vector Labs, Burlingame, Calif.) en tampón Tris-ascorbato, oscilando las concentraciones desde 5 ng hasta 500 ng por pocillo.

Ejemplo 25: Captación potenciada de RX3-DsRED ensamblada en RPBLA de larvas de insecto por macrófagos

El ADNc que codifica para RX3-DsRED y DsRED se clonó en el vector FastBac de baculovirus (Invitrogen) para obtener pFB-RX3-DsRED y pFB-DsRED. Se usaron estas construcciones para infectar larvas de *Trichoplusia ni*. Se homogeneizaron larvas congeladas que expresan las proteínas RX3-DsRED y DsRED y se cargaron en un gradiente escalonado de densidad. Tras centrifugación a 80000 x g en un rotor oscilante durante 2 horas, se realizó el análisis de la proteína de fusión RX3-DsRED y el control correspondiente a DsRED expresados en el citosol mediante inmunotransferencia (figura 2C). Tal como se esperaba, cuando se expresó en el citosol de las células larvarias, la proteína DsRED no se ensambló en estructuras sumamente densas y se localizó en el sobrenadante y la fracción F35 (figura 2C, carriles 2 y 3). Por otro lado, la proteína de fusión RX3-DsRED pudo ensamblarse y acumularse en estructuras densas que pueden aislarse de F56 (figura 2C, carril 5). Tal como se muestra mediante el análisis de microscopía confocal del ejemplo 4 (figura4), la RX3-DsRED se acumuló en RPBLA de forma redonda.

Los RPBLA de RX3-DsRED procedentes de F56 se diluyeron 3 veces en PBP5 (HEPES 10 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM) y se recogieron en el sedimento mediante centrifugación a 80000 x g a 4°C en un rotor oscilante durante 2 horas. El sedimento se resuspendió en tampón PBS y se cuantificó el número de RPBLA mediante FACS. A partir de 1 larva infectada con el vector pFB-RX3-DsRED, se obtuvieron aproximadamente 1×10^9 partículas de RPBLA a una concentración de 500.000 RPBLA por microlitro (μ l).

Se ha descrito que la presentación de antígeno por las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como los macrófagos y las células dendríticas es un proceso clave necesario para inducir la respuesta inmunitaria (Greenberg *et al*, Current Op. Immunology (2002), 14:136-145). En este proceso, la CPA fagocita el antígeno, que posteriormente se escinde en pequeños péptidos en el fagolisosoma. Estos péptidos interactúan con el CMHII y se separan hacia la membrana plasmática para presentarse en las respuestas inmunitarias mediadas por células y anticuerpos (Villadangos *et al.*, Immunological Reviews (2005) 207:101-205).

Para determinar la antigenicidad de las proteínas de fusión de RX3 presentes dentro de los RPBLA, se incubó un cultivo de macrófagos con estos orgánulos a diferentes razones de RPBLA/célula (100:1 y 1000:1). Los cultivos de macrófagos se hicieron crecer en condiciones de privación o en presencia de (M-CSF). Estos cultivos celulares se incubaron con los RPBLA durante 1 hora, y 1, 2, 5 y 10 horas tras la retirada de los RPBLA, se lavaron extensamente los macrófagos con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Posteriormente, estos macrófagos fijados se analizaron mediante FACS para cuantificar la cantidad de RPBLA fluorescentes captados por los macrófagos así como el porcentaje de macrófagos que habían fagocitado los RPBLA de RX3-DsRED fluorescentes.

Porcentaje de macrófagos fluorescentes

Tiempo (horas)	Con privación (razón de RPBLA/célula 100:1)		M-CSF (razones de RPBLA/célula 100:1)		M-CSF (razón de RPBLA/célula 1000:1)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
cero	1,19	1,21	0,82	0,35	0,82	0,35
1	65,42	2,29	65,19	3,2	85,78	1,65
2	79,64	1,66	75,08	3,94	91,55	1,5
5	91,85	2,17	87,68	1,58	91,53	1,09
10	88,91	0,7	90,54	1,59	94,4	0,08

A partir de estos resultados, queda claro que los macrófagos fagocitaron los RPBKA de RX3-DsRED con una avidez inesperada. Incluso a la razón de RPBLA/células menor (1:100) y en presencia de M-CSF, 1 hora tras la adición de los RPBLA, el 65% de los macrófagos son fluorescentes. Incluso, la presencia de una citocina mitógena, tal como M-CSF, que tiene un efecto negativo sobre la fagocitosis de los macrófagos puede no alterar significativamente la captación de los RPBLA. A las 5 horas, casi todos (más del 80%) los macrófagos eran fluorescentes, lo que significa que la mayoría de las células habían captado algunos RPBLA del medio.

Cuando se analizó la cantidad de fluorescencia asociada con los macrófagos con el tiempo de incubación, el resultado fue incluso más sorprendente. En cualquiera de las condiciones analizadas (razón de RPBLA/células o presencia de ausencia de M-CSF) no se observó un efecto de saturación sobre la capacidad de los macrófagos para captar los RPBLA. Si los resultados de las tablas anteriores y siguientes se comparan a las 5 y 10 horas de incubación, se observa que casi todos los macrófagos son fluorescentes, pero existe un aumento continuo en la fluorescencia total asociada a los macrófagos. Este resultado indica que, los macrófagos están fagocitando una gran cantidad de partículas de RPBLA fluorescentes.

Fluorescencia de los macrófagos dependiente del tiempo

Tiempo (horas)	Con privación (razón de RPBLA/célula 100:1)		M-CSF (razones de RPBLA/célula 100:1)		M-CSF (razón de RPBLA/célula 1000:1)	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0	0,975	0,31	0,725	0,1	0,725	0,1
1	8,9	0,42	10,3	1,13	24	1,7
2	16,35	0,07	16,25	0,5	41,5	0,3
5	64,65	2,05	42,35	4,45	93,3	2,2
10	120,7	1,84	79,9	5,66	125,65	13,08

Para demostrar que los RPBLA que contienen la proteína de fusión RX3-DsRED estaban dentro de los macrófagos y no simplemente adsorbidos a la membrana plasmática, se realizaron análisis de microscopía confocal. La figura 7A (panel izquierdo) muestra algunos de estos macrófagos incubados con partículas de RX3-DsRED (a 100:1) durante 1 hora. En el panel izquierdo de la misma figura, una sección de 1 micrómetro de las mismas células muestra la típica autofluorescencia verde de los macrófagos observados con un filtro verde (figura 7A, punta de flecha blanca). La presencia del núcleo y las partículas de RPBLA fluorescentes rojas (figura 7A, punta de flecha negra) en la misma sección óptica indicó que los RPBLA habían sido captados en el interior de las células por fagocitosis.

Otro factor importante a analizar es la degradación del inmunógeno una vez que se ha fagocitado por el macrófago. Es necesaria la degradación del antígeno para producir los péptidos antigénicos que se presentan sobre el receptor de CMHII. El análisis del patrón fluorescente de DsRED de los macrófagos con el tiempo mostró que las partículas de RPBLA se habían digerido activamente.

Otro grupo de micrografías muestra que tras 1 hora de incubación, las partículas de RPBLA no estaban completamente degradadas y todavía podían observarse dentro de las células (figura 7B, paneles superiores). Tras 10 horas, el patrón de fluorescencia roja era más homogéneo a lo largo de todas las células, lo que indica que los macrófagos habían empezado a degradar las partículas de RPBLA (figura 7B, paneles inferiores).

Ejemplo 26: Captación potenciada de RX3-DsRED en los RPBLA de larvas de insecto por células dendríticas

Las células dendríticas desempeñan un papel central de presentación de antígenos para inducir el sistema inmunitario (Blander et al., Nature Immunology (2006) 10:1029-1035). Aunque poco frecuentes, las células dendríticas son las CPA más altamente especializadas, con capacidad tanto para instigar como para regular la reactividad inmunitaria (Lau AH et al Gut 2003 52:307-314). Para evaluar la capacidad de esas células para fagocitar proteínas de fusión RX3-DsRED ensambladas en RPBLA de larvas de insecto, se incubó un cultivo de células dendríticas con estos orgánulos a una razón de 100 RPBLA/célula. Se prepararon dos clases de RPBLA: (i) RPBLA aislados tal como se describió anteriormente y (ii) los mismos RPBLA a través de lavado completo en Tris 50 mM, pH 8, Triton X-100 al 1%, con el fin de eliminar la membrana de RE. Se hicieron crecer los cultivos de células dendríticas en condiciones de privación en presencia de RPBLA, y se analizaron las muestras a las 0, 1, 2, 5 y 10 horas.

Porcentaje de células dendríticas fluorescentes

Tiempo (horas)	% de células dendríticas fluorescentes			
	RPBLA		RPBLA sin membrana	
	Media	DE	Media	DE
0	1,43	-	1,41	-
1	26,76	-	36,46	0,28
2	33,79	0,6	50,785	0,21
5	45,845	0,07	67,275	3,4
10	61,885	5,73	74,97	4,17

Fluorescencia de células dendríticas dependiente del tiempo

Tiempo (horas)	Fluorescencia asociada a células dendríticas			
	RPBLA		RPBLA sin membrana	
	Media	DE	Media	DE
0	0,5	-	1,1	-
1	3,1	-	5,1	0,28
2	3,55	0,6	5,05	0,21
5	25,15	0,07	54	3,4
10	37,05	5,73	74,05	4,17

Tal como puede concluirse a partir de las tablas anteriores, las células dendríticas muestran una sorprendente avidez por los RPBLA. Tal como se esperaba, tienen una velocidad de fagocitosis más lenta en comparación con los macrófagos (compárense las tablas anteriores), tal como se describe en otra parte. El porcentaje de células dendríticas fluorescentes aumenta a lo largo de todo el transcurso de tiempo analizado, y no se observó un efecto de saturación ni siquiera a las 10 horas tras la incubación de los RPBLA. Pueden extraerse conclusiones similares cuando se analiza la cantidad de fluorescencia asociada a los macrófagos con el tiempo.

La capacidad de las células dendríticas para captar los RPBLA no mostró un efecto de saturación. Esta falta de efecto puede explicarse por el hecho de que cada vez más células dendríticas se inducen a fagocitosis (y se vuelven fluorescentes) con el tiempo. No obstante, también es posible que la capacidad de fagocitosis de esas células no se sature, tal como se ha observado con los macrófagos.

Inesperadamente, el análisis de FACS de células dendríticas incubadas con RPBLA sin membrana mostró un porcentaje significativamente superior de células dendríticas fluorescentes que las mismas células incubadas con RPBLA que contienen membrana. Además, la fluorescencia de estas células dendríticas también fue superior además. Se obtuvieron resultados similares usando los macrófagos con RPBLA sin membrana. Esto fue algo sorprendente ya que se esperaba que la presencia de proteínas de membrana derivadas de insecto en los RPBLA que contienen membrana se reconocería como proteínas foráneas por las células dendríticas murinas, y así potenciaría la fagocitosis. Por tanto, es evidente que los RPBLA derivados de insecto en presencia o ausencia de la membrana circundante son vehículos de presentación de antígenos muy eficaces.

Para demostrar que los RPBLA y RPBLA sin membrana que contienen la proteína de fusión RX3-DsRED se captaban por las células dendríticas, se realizaron análisis de microscopía óptica. La figura 8A (superior) muestra células dendríticas incubadas durante 2, 5 y 10 horas con RPBLA de RX3-DsRED (razón 100:1). En la parte inferior de la figura 8B, la fluorescencia roja de la proteína DsRED ilustra la captación de los RPBLA por esas células. A las 2 horas de incubación, puede observarse cierta fagocitosis, pero la mayor parte de los RPBLA sólo están adsorbidos a la membrana plasmática. A las 5 horas, e incluso más a las 10 horas, se observaron muchos RPBLA fluorescentes rojos fagocitados. Se obtuvieron resultados similares cuando se incubaron células dendríticas con RPBLA sin membrana (figura 8B).

Es importante observar que incluso a las 10 horas de incubación con RPBLA o RPBLA sin membrana, la mayor parte de las partículas fagocitadas siguen siendo visibles como partículas, lo que significa que había tenido lugar poca proteólisis. Esta observación concuerda con la observación previa que muestra que la cinética de la adquisición de proteasas, y así, de la proteólisis es más lenta en las células dendríticas que en los macrófagos (Lennon-Dum'enil *et al.* (2002) J. Exp. Med. 196:529-540). Estas condiciones pueden limitar la proteólisis de proteínas en células dendríticas y favorecer la generación de antígenos peptídicos de longitud apropiada para la carga en moléculas de MHC de clase II.

Ejemplo 27: Fagocitosis de macrófagos y células dendríticas

Macrófagos

Los macrófagos se obtuvieron de tuétano de ratones Balb/C. Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron el fémur y la tibia. Se cortaron los huesos y se extrajo el tuétano con medio DMEM usando una jeringa. Se cultivó el tuétano sobre una placa Petri de 150 mm con medio DMEM completo (complementado con SFT al 20% y células L al 30%). Se obtuvo un cultivo de macrófagos de una pureza del 99% tras 7 días de incubación a 37°C.

Los macrófagos diferenciados se cultivaron en medio completo para proporcionar 350.000 células por pocillo. Cuando se adhirieron las células, se eliminó el medio y se incubaron las células con nuevo medio que contenía RPBLA de RX3-DsRED de larvas. Se realizó el experimento con 100 ó 1000 partículas: 1 célula. Se contó el número de partículas (RPBLA) mediante FACS Coulter Epics XL usando el láser de argón a 488 nm para la excitación y FL2

a 575 nm +/-30 para la emisión. Se usó el contador de flujo de Beckman Coulter ref. 7547053 (lote 754896F) para comprobar el flujo.

5 Tras diferentes tiempos (0, 1, 2, 5 y 10 horas) se eliminó el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Se permitió que las células se recuperasen y entonces se fijaron mediante PBS con un 2% de paraformaldehído. Se almacenaron los macrófagos tratados a 4°C y se analizó la fluorescencia mediante FACS (con el mismo programa usado para el recuento).

10 Para verificar que las partículas de RX3-DsRED se habían fagocitado dentro de las células, se realizó un experimento de inmunocitoquímica. Se incubaron los macrófagos diferenciados (50.000 células/pocillo) con partículas de RX3-DsRED 100:1 durante 1 hora. Tras la incubación, se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con PBS con formaldehído al 2% durante 15 minutos. Se analizaron las células tratadas mediante microscopía confocal.

15 Células dendríticas

Se cultivó el tuétano de ratones Balb/C con medio completo (DMEM, SFTS al 10%, GM-CSF 5 ng/ml) durante un día. Con el fin de eliminar los granulocitos, se agitaron las placas y se cambió el medio dos veces. Entonces se cambió el medio dos veces sin agitación y se incubó durante 2 días para obtener células dendríticas inmaduras. Se incubaron las células dendríticas con partículas de RX3-DsRED 100:1 durante 1, 5 y 10 horas. Tras los tratamientos, se fijaron las células con paraformaldehído al 2%, se guardaron a 4°C y se analizó la fluorescencia mediante FACS.

El uso del artículo "un" o "una" pretende incluir uno o más.

25 Los ejemplos anteriores se conciben como ilustrativos y no se deben tomar como limitantes.

LISTA DE SECUENCIAS

30 <110> ERA BIOTECH, S.L.

<120> PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS

<130> P2747PC00

35 <160> 74

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> hexapeptido de dominio de repetición de la proteína gamma-Zeína
<400> 1

50 Pro Pro Pro Val His Leu
1 5

55 <210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> RX3
<400> 2

65 Pro Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro
1 5 10 15

ES 2 387 970 T3

Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro
 20 25 30
 5
 Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His
 35 40 45
 10
 Leu Pro Pro Pro Pro
 50
 15 <210> 3
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Alfa-zeína
 <400> 3
 25 Gln Gln Gln Gln Gln Phe Leu Pro Ala Leu Ser Gln Leu Asp Val Val
 1 5 10 15
 30 Asn Pro Val Ala Tyr Leu Gln Gln Gln Leu Leu Ala Ser Asn Pro Leu
 20 25 30
 35 Ala Leu Ala Asn Val Ala Ala Tyr Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Gln
 35 40 45
 Phe Leu Pro Ala Leu Ser Gln Leu Ala Met Val Asn Pro Ala Ala Tyr
 50 55 60
 40 Leu
 65
 45 <210> 4
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Prolamina de arroz
 <400> 4
 55 Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly
 1 5 10 15
 60 Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln Ser Ala Thr Phe Gln Leu Arg Asn
 20 25 30

ES 2 387 970 T3

Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala Leu Val Ala Gln Gln Ser His Cys
35 40 45

5 Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala Ile Ala Gln Gln Leu Gln Leu Gln
50 55 60

10 Gln Phe Gly Asp Leu Tyr
65 70

15 <210> 5
<211> 672
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Gamma-zeína

25 <400> 5
atgaggggtgt tgctcgttgc cctcgctctc ctggctctcg ctgcgagcgc cacctccacg 60
catacaagcg gcggctgcgg ctgccagcca ccgccgccgg ttcattctacc gccgccgggtg 120
catctgccac ctccggttca cctgccacct ccggtgcac tcccaccgcc ggtccacctg 180
ccgccgccgg tccacctgcc accgccggtc catgtgccgc cgccggttca tctgccgccg 240
30 ccaccatgcc actaccctac tcaaccgccc cggcctcagc ctcatcccca gccacaccca 300
tgcccgtgcc aacagccgca tccaagcccg tgccagctgc agggaaacctg cggcgttggtc 360
agcaccgccga tcttggggca gtgcgtcgag tttctgaggc atcagtgcag cccgacggcg 420
35 acgccctact gctcgcttca gtgccagtcg ttgcggcagc agtggttgcca gcagctcagg 480
caggtggagc cgcagcaccg gtaccaggcg atcttcgggt tggtcctcca gtccatcctg 540
40 cagcagcagc cgcaaagcgg ccaggctcgc gggctgttgg cggcgcagat agcgcagcaa 600
ctgacggcga tgtgcggcct gcagcagccg actccatgcc cctacgctgc tgccggcggt 660
gtccccccacg cc 672

45 <210> 6
<211> 224
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> Gamma-zeína

55 <400> 6

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
1 5 10 15

60 Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
20 25 30

ES 2 387 970 T3

5 Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35 40 45
 10 Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50 55 60
 15 His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65 70 75 80
 20 Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln
 100 105 110
 25 Leu Gln Gly Thr Cys Gly Val Gly Ser Thr Pro Ile Leu Gly Gln Cys
 115 120 125
 30 Val Glu Phe Leu Arg His Gln Cys Ser Pro Thr Ala Thr Pro Tyr Cys
 130 135 140
 35 Ser Pro Gln Cys Gln Ser Leu Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg
 145 150 155 160
 40 Gln Val Glu Pro Gln His Arg Tyr Gln Ala Ile Phe Gly Leu Val Leu
 165 170 175
 45 Gln Ser Ile Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Gly Leu
 180 185 190
 50 Leu Ala Ala Gln Ile Ala Gln Gln Leu Thr Ala Met Cys Gly Leu Gln
 195 200 205
 55 Gln Pro Thr Pro Cys Pro Tyr Ala Ala Ala Gly Gly Val Pro His Ala
 210 215 220
 60 atgagggtgt tgctcggttgc cctcgcctctc ctggctctcg ctgcgagcgc cacctccacg 60
 <210> 7
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> RX3
 <400> 7

ES 2 387 970 T3

catacaagcg gcggctgcgg ctgccagcca ccgccgccgg ttcattctacc gccgccggtg 120
 catctgccac ctccggttca cctgccacct ccggtgcata tcccaccgcc ggtccacctg 180
 5 ccgccgccgg tccacctgcc accgccggtc catgtgccgc cgcgggttca tctgccgccg 240
 ccaccatgcc actaccctac tcaaccgccc cggcctcagc ctcatcccca gccacacca 300
 tgcccgtgcc aacagccgca tccaagcccg tgccagacc 339
 10
 <210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> RX3
 20 <400> 8
 Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 25 Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
 20 25 30
 30 Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35 40 45
 35 Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50 55 60
 His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65 70 75 80
 40 Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro
 85 90 95
 45 Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln
 100 105 110
 50 Tyr
 <210> 9
 <211> 240
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> R3
 60 <400> 9
 atgagggtgt tgctcggttg cctcgctctc ctggctctcg ctgcgagcgc cacctccacg 60

ES 2 387 970 T3

catacaagcg gcggctgcgg ctgccagcca ccgccgccgg ttcattctacc gccgccggtg 120
 catctgccac ctccggttca cctgccacct ccggtgcata tcccaccgcc ggtccacctg 180
 5 ccgccgccgg tccacctgcc accgccggtc catgtgccgc cgcgggttca tctgccgccg 240

 <210> 10
 <211> 92
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> R3
 15 <400> 10

 Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 20
 Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
 20 25 30
 25
 Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu
 35 40 45
 30 Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro Pro Val
 50 55 60
 35 His Leu Pro Pro Pro Val His Val Pro Pro Pro Val His Leu Pro Pro
 65 70 75 80
 Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro Arg Tyr
 85 90
 40
 <210> 11
 <211> 213
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> P4
 50 <400> 11
 atgaggggtgt tgctcgttgc cctcgtctctc ctggctctcg ctgcgagcgc cacctccacg 60
 catacaagcg gcggctgcgg ctgccagcca ccgccgccgg ttcattctgcc gccgccacca 120
 55 tgccactacc ctacacaacc gccccggcct cagcctcatc cccagccaca cccatgcccc 180
 tgccaacagc cgcattccaag cccgtgccag acc 213
 60 <210> 12
 <211> 71
 <212> PRT

ES 2 387 970 T3

<213> Artificial

<220>

<223> P4

5

<400> 12

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
1 5 10 15

10

Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Pro Pro Pro
20 25 30

15

Pro Val His Leu Pro Pro Pro Pro Cys His Tyr Pro Thr Gln Pro Pro
35 40 45

20

Arg Pro Gln Pro His Pro Gln Pro His Pro Cys Pro Cys Gln Gln Pro
50 55 60

25

His Pro Ser Pro Cys Gln Tyr
65 70

30

<210> 13

<211> 180

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> X10

35

<400> 13

atgagggtgt tgctcggttg cctcgctctc ctggctctcg ctgcgagcgc cacctccacg 60

catacaagcg gcggctgcgg ctgccaatgc cactacccta ctcaaccgcc ccggcctcag 120

40

cctcatcccc agccacaccc atgcccgtgc caacagccgc atccaagccc gtgccagacc 180

45

<210> 14

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> X10

50

<400> 14

Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
1 5 10 15

55

Ala Thr Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Cys Gly Cys Gln Cys His Tyr
20 25 30

60

Pro Thr Gln Pro Pro Arg Pro Gln Pro His Pro Gln Pro His Pro Cys
35 40 45

ES 2 387 970 T3

Pro Cys Gln Gln Pro His Pro Ser Pro Cys Gln Tyr
50 55 60

5

<210> 15
<211> 150
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> rP13 – prolamina de arroz de 13 kD

15 <400> 15

Met Lys Ile Ile Phe Val Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Cys Ser
1 5 10 15

20 Ala Ser Ala Gln Phe Asp Val Leu Gly Gln Ser Tyr Arg Gln Tyr Gln
20 25 30

25 Leu Gln Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Gln Val Leu Ser Pro Tyr Asn
35 40 45

30 Glu Phe Val Arg Gln Gln Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Pro Phe Leu Gln
50 55 60

35 Ser Ala Thr Phe Gln Leu Arg Asn Asn Gln Val Trp Gln Gln Leu Ala
65 70 75 80

Leu Val Ala Gln Gln Ser His Cys Gln Asp Ile Asn Ile Val Gln Ala
85 90 95

40 Ile Ala Gln Gln Leu Gln Leu Gln Gln Phe Gly Asp Leu Tyr Phe Asp
100 105 110

45 Arg Asn Leu Ala Gln Ala Gln Ala Leu Leu Ala Phe Asn Val Pro Ser
115 120 125

50 Arg Tyr Gly Ile Tyr Pro Arg Tyr Tyr Gly Ala Pro Ser Thr Ile Thr
130 135 140

55 Thr Leu Gly Gly Val Leu
145 150

<210> 16
<211> 450
<212> ADN
60 <213> Artificial

ES 2 387 970 T3

<220>

<223> rP13 – prolamina de arroz de 13 kD

<400> 16

5 atgaagatca ttttcgtctt tgctctcctt gctattgctg catgcagcgc ctctgcgcag 60
 tttgatgttt taggtcaaag ttataggcaa tatcagctgc agtcgcctgt cctgctacag 120
 caacaggtgc ttagcccata taatgagttc gtaaggcagc agtatggcat agcggcaagc 180
 10 cccttcttgc aatcagctac gtttcaactg agaaacaacc aagtctggca acagctcgcg 240
 ctggtggcgc aacaatctca ctgtcaggac attaacattg ttcaggccat agcgcagcag 300
 15 ctacaactcc agcagtttgg tgatctctac tttgatcgga atctggctca agctcaagct 360
 ctggttggtt ttaacgtgcc atctagatat ggtatctacc ctaggtacta tgggtgcaccc 420
 agtaccatta ccacccttgg cggtgtcttg 450

20

<210> 17

<211> 144

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> 22aZt fragmento N-terminal de la alfa-zeína de maiz de 22 kD

30 <400> 17

Met Ala Thr Lys Ile Leu Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Val
 1 5 10 15

35

Ser Ala Thr Asn Ala Phe Ile Ile Pro Gln Cys Ser Leu Ala Pro Ser
 20 25 30

40

Ala Ile Ile Pro Gln Phe Leu Pro Pro Val Thr Ser Met Gly Phe Glu
 35 40 45

45

His Leu Ala Val Gln Ala Tyr Arg Leu Gln Gln Ala Leu Ala Ala Ser
 50 55 60

50

Val Leu Gln Gln Pro Ile Asn Gln Leu Gln Gln Gln Ser Leu Ala His
 65 70 75 80

Leu Thr Ile Gln Thr Ile Ala Thr Gln Gln Gln Gln Gln Phe Leu Pro
 85 90 95

55

Ala Leu Ser Gln Leu Asp Val Val Asn Pro Val Ala Tyr Leu Gln Gln
 100 105 110

60

Gln Leu Leu Ala Ser Asn Pro Leu Ala Leu Ala Asn Val Ala Ala Tyr
 115 120 125

ES 2 387 970 T3

Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Gln Phe Leu Pro Ala Leu Ser Gln Leu
130 135 140

5

<210> 18
<211> 432
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> 22aZt fragmento N-terminal de la alfa-zeína de maiz de 22 kD

15 <400> 18
atggctacca agatattagc cctccttgcg cttcttgccc tttttgtgag cgcaacaaat 60
gcggttcatta ttccacaatg ctcaattgct cctagtgcc ttataccaca gttcctccca 120
20 ccagttactt caatgggctt cgaacaccta gctgtgcaag cctacaggct acaacaagcg 180
cttgcgga gcgctttaca acaaccaatt aaccaattgc aacaacaatc cttggcacat 240
ctaaccatac aaaccatcgc aacgcaacag caacaacagt tcctaccagc actgagccaa 300
25 ctagatgtgg tgaacctgt cgctacttg caacagcagc tgcttgcatc caaccactt 360
gctctggcaa acgtagctgc ataccaacaa caacaacaat tgcagcagtt tctgccagcg 420
30 ctcaagtcaac ta 432

<210> 19
<211> 283
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Precursor de Gamma-Gliadina

40 <400> 19

Asn Met Gln Val Asp Pro Ser Gly Gln Val Gln Trp Pro Gln Gln Gln
1 5 10 15

45

Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Cys Gln Gln Pro Gln Arg Thr
20 25 30

50

Ile Pro Gln Pro His Gln Thr Phe His His Gln Pro Gln Gln Thr Phe
35 40 45

55

Pro Gln Pro Gln Gln Thr Tyr Pro His Gln Pro Gln Gln Gln Phe Pro
50 55 60

60

Gln Thr Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Thr Phe
65 70 75 80

ES 2 387 970 T3

	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Leu	Pro	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	85	90	95
5	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Ser	Gln	Gln	Pro	100	105	110
10	Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln	Phe	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	115	120	125
15	Pro	Gln	Gln	Ser	Phe	Pro	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Ala	Ile	Gln	Ser	Phe	130	135	140
20	Leu	Gln	Gln	Gln	Met	Asn	Pro	Cys	Lys	Asn	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Cys	145	150	155
	Asn	His	Val	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	165	170	175
25	Ser	Asp	Cys	Gln	Val	Met	Gln	Gln	Gln	Cys	Cys	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	180	185	190
30	Ile	Pro	Gln	Gln	Leu	Gln	Cys	Ala	Ala	Ile	His	Ser	Val	Ala	His	Ser	195	200	205
35	Ile	Ile	Met	Gln	Gln	Glu	Gln	Gln	Gln	Gly	Val	Pro	Ile	Leu	Arg	Pro	210	215	220
	Leu	Phe	Gln	Leu	Ala	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	Ile	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	225	230	235
40	Ala	Gln	Leu	Glu	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Thr	245	250	255
45	Met	Cys	Asn	Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Asp	Cys	Ser	Thr	Ile	Asn	Val	Pro	260	265	270
50	Tyr	Ala	Asn	Ile	Asp	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Gln						275	280	
55	<210> 20																		
	<211> 2086																		
	<212> ADN																		
	<213> Artificial																		
	<220>																		
	<223> Precursor Gamma-Gliadina																		
60	<400> 20																		

ES 2 387 970 T3

	gcatgcattg tcaaagtttg tgaagtagaa ttaataacct tttgggttatt gatcactgta	60
	tgtatcttag atgtcccgtg gcaacggtaa gggcattcac ctagtactag tccaatatta	120
5	attaataact tgcacagaat tacaaccatt gacataaaaa ggaaatatga tgagtcattg	180
	attgattcat gttcaacatt actacccttg acataaaaaga agaatttgac gagtcgtatt	240
10	agcttggttca tcttaccatc atactatact gcaagctagt ttaaaaaaga atyaaagtcc	300
	agaatgaaca gtagaatagc ctgatctatc ttttaacaaca tgcacaagaa taaaaattta	360
	gtcccttgca agctatgaag atttgggttta tgcctaacaa catgataaac ttagatccaa	420
15	aaggaatgca atctagataa ttgtttgact tgtaaagtcg ataagatgag tcagtgccaa	480
	ttataaagtt ttgcgacctc ttagatcata tgtacaataa aaaggcaact ttgctgacca	540
20	ctccaaaagt acgtttgtat gtagtgccac caaacacaa acaccaaata atcagtttga	600
	taagcatcga atcactttta aaagtgaag aaataatgaa aagaaacct accatggtag	660
	ctataaaaag cctgtaatat gtacactcca taccatcatc catccttcac acaactagag	720
25	cacaagcatc aaatccaagt aagtattagt taacgcaaat ccaccatgaa gaccttactc	780
	atcctaacaa tccttgcgat ggcaacaacc atcgccaccg ccaatatgca agtcgacccc	840
30	agcggccaag tacaatggcc acaacaacaa ccattccccc agccccaaca accattctgc	900
	cagcaaccac aacgaactat tccccaaacc catcaaacat tccaccatca accacaacaa	960
	acatttcccc aacccaaca aacatacccc catcaaccac aacaacaatt tccccagacc	1020
35	caacaaccac aacaaccatt tccccagccc caacaacat tcccccaaca accccaacta	1080
	ccatttcccc aacaacccca acaaccattc cccagcctc agcaacccca acaaccattt	1140
40	ccccagtcac aacaaccaca acaacctttt cccagcccc aacaacaatt tccgcagccc	1200
	caacaaccac aacaatcatt cccccaaaca caacaaccgg cgattcagtc atttctacaa	1260
	caacagatga acccctgcaa gaatttcctc ttgcagcaat gcaaccatgt gtcattggtg	1320
45	tcattctctg tgtcaataat tttgccacga agtgattgcc aggtgatgca gcaacaatgt	1380
	tgccaacaac tagcacaat tcctcaacag ctccagtgcg cagccatcca cagcgtcgcg	1440
50	cattccatca tcatgcaaca agaacaacaa caaggcgtgc cgatcctgcg gccactattt	1500
	cagctcgcgc agggctctggg tatcatccaa cctcaacaac cagctcaatt ggaggggatc	1560
	aggtcattgg tattgaaaac tcttccaacc atgtgcaacg tgtatgtgcc acctgactgc	1620
55	tccaccatca acgtaccata tgccaacata gacgtggca ttggtggcca atgaaaaatg	1680
	caagatcatc attgcttagc tgatgcacca atcgtttagc cgatgacaaa taaagtgggtg	1740
60	tgccaccatca tgtgtgaccc cgaccagtgc tagttcaagc ttgggaataa aagacaaaca	1800

ES 2 387 970 T3

aagttcttgt ttgctagcat tgcttgtcac tgttacattc actttttatt tcgatgttca 1860
 tccctaaccg caatcctage cttacacgtc aatagctage tgcttgtgct ggcagggttac 1920
 5 tatataatct atcaattaat ggtcgacctt ttaatccaag taataggcta ttgatagact 1980
 gctcccaagc cgaccgagca cctatcagtt acggatttct tgaacattgc acactataat 2040
 aattcaacgt atttcaacct ctagaagtaa agggcatttt agtagc 2086
 10
 <210> 21
 <211> 537
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Beta zeína
 20 <400> 21
 atgaagatgg tcatcgttct cgtcgtgtgc ctggctctgt cagctgccag cgcctctgca 60
 atgcagatgc cctgccccctg cgcggggctg cagggtctgt acggcgctgg cgccggcctg 120
 25 acgacgatga tgggcgccgg cgggctgtac ccctacgcgg agtacctgag gcagccgcag 180
 tgcagcccgc tggcgggcgg gccctactac gccgggtgtg ggcagccgag cgccatgttc 240
 cagccgctcc ggcaacagtg ctgccagcag cagatgagga tgatggacgt gcagtccgtc 300
 30 gcgcagcagc tgcagatgat gatgcagctt gagcgtgccg ctgccgccag cagcagcctg 360
 tacgagccag ctctgatgca gcagcagcag cagctgctgg cagcccaggg tctcaacccc 420
 35 atggccatga tgatggcgca gaacatgccg gccatgggtg gactctacca gtaccagctg 480
 cccagctacc gcaccaaccc ctgtggcgtc tccgctgcca ttccgcccta ctactga 537
 40 <210> 22
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Beta zeína
 <400> 22
 50 Met Lys Met Val Ile Val Leu Val Val Cys Leu Ala Leu Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Ala Met Gln Met Pro Cys Pro Cys Ala Gly Leu Gln Gly
 55 20 25 30
 Leu Tyr Gly Ala Gly Ala Gly Leu Thr Thr Met Met Gly Ala Gly Gly
 35 40 45
 60 Leu Tyr Pro Tyr Ala Glu Tyr Leu Arg Gln Pro Gln Cys Ser Pro Leu

ES 2 387 970 T3

	50		55		60														
5	Ala	Ala	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Cys	Gly	Gln	Pro	Ser	Ala	Met	Phe			
	65					70					75					80			
10	Gln	Pro	Leu	Arg	Gln	Gln	Cys	Cys	Gln	Gln	Gln	Met	Arg	Met	Met	Asp			
					85					90					95				
	Val	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Gln	Leu	Gln	Met	Met	Met	Gln	Leu	Glu	Arg			
				100					105					110					
15																			
	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Pro	Ala	Leu	Met	Gln	Gln			
			115					120					125						
20	Gln	Gln	Gln	Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Pro	Met	Ala	Met	Met			
		130					135					140							
25	Met	Ala	Gln	Asn	Met	Pro	Ala	Met	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Tyr	Gln	Leu			
	145				150						155					160			
30	Pro	Ser	Tyr	Arg	Thr	Asn	Pro	Cys	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Ile	Pro	Pro			
					165					170					175				
	Tyr	Tyr																	
35																			
	<210>	23																	
	<211>	453																	
	<212>	ADN																	
	<213>	Artificial																	
40																			
	<220>																		
	<223>	Delta zeina 10 kD																	
	<400>	23																	
45	atggcagcca	agatgcttgc	attgttcgct	ctcctagctc	tttgtgcaag	cgccactagt													60
	gcgacgcata	ttccagggca	cttgccacca	gtcatgccat	tgggtaccat	gaacccatgc													120
	atgcagtact	gcatgatgca	acaggggctt	gccagcttga	tggcgtgtcc	gtccctgatg													180
50	ctgcagcaac	tgttggcctt	accgcttcag	acgatgccag	tgatgatgcc	acagatgatg													240
	acgcctaaca	tgatgtcacc	attgatgatg	ccgagcatga	tgtcaccaat	ggctcttgccg													300
55	agcatgatgt	cgcaaagatg	gatgccacaa	tgtcactgcg	acgccgtctc	gcagattatg													360
	ctgcaacagc	agttaccatt	catgttcaac	ccaatggcca	tgacgattcc	acccatgttc													420
	ttacagcaac	cctttgttgg	tgctgcattc	tag															453
60																			

ES 2 387 970 T3

<210> 24
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Delta zeína 10 kD
 <400> 24
 10
 Met Ala Ala Lys Met Leu Ala Leu Phe Ala Leu Leu Ala Leu Cys Ala
 1 5 10 15
 15 Ser Ala Thr Ser Ala Thr His Ile Pro Gly His Leu Pro Pro Val Met
 20 25 30
 20 Pro Leu Gly Thr Met Asn Pro Cys Met Gln Tyr Cys Met Met Gln Gln
 35 40 45
 25 Gly Leu Ala Ser Leu Met Ala Cys Pro Ser Leu Met Leu Gln Gln Leu
 50 55 60
 Leu Ala Leu Pro Leu Gln Thr Met Pro Val Met Met Pro Gln Met Met
 65 70 75 80
 30 Thr Pro Asn Met Met Ser Pro Leu Met Met Pro Ser Met Met Ser Pro
 85 90 95
 35 Met Val Leu Pro Ser Met Met Ser Gln Met Met Met Pro Gln Cys His
 100 105 110
 40 Cys Asp Ala Val Ser Gln Ile Met Leu Gln Gln Gln Leu Pro Phe Met
 115 120 125
 Phe Asn Pro Met Ala Met Thr Ile Pro Pro Met Phe Leu Gln Gln Pro
 130 135 140
 45 Phe Val Gly Ala Ala Phe
 145 150
 50
 <210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido señal de Gamma-Zeína
 <400> 25
 60 Met Arg Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ser
 5 10 15

ES 2 387 970 T3

Ala Thr Ser

5 <210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido señal de Alfa-Gliadina

<400> 26
 Met Lys Thr Phe Leu Ile Leu Val Leu Leu Ala Ile Val Ala Thr Thr
 5 10 15

15 Ala Thr Thr Ala
 20

20 <210> 27
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido señal de gamma-gliadina

<400> 27
 Met Lys Thr Leu Leu Ile Leu Thr Ile Leu Ala Met Ala Ile Thr Ile
 5 10 15

30 Gly Thr Ala Asn Met
 20

35 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido señal de PR10

<400> 28
 Met Asn Phe Leu Lys Ser Phe Pro Phe Tyr Ala Phe Leu Cys Phe Gly
 5 10 15

45 Gln Tyr Phe Val Ala Val Thr His Ala
 20 25

50 <210> 29
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> ECFP

<400> 29
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

ES 2 387 970 T3

cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 5 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480
 10 ggcatacagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
 15 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

 <210> 30
 20 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 25 <223> ECFP

 <400> 30

 30 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 35
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 40
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 45 Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 50 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 55
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 60
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

ES 2 387 970 T3

	130		135		140	
5	Asn Tyr Ile Ser His	Asn Val Tyr Ile Thr	Ala Asp Lys Gln Lys	Asn		
	145	150	155	160		
10	Gly Ile Lys Ala Asn Phe	Lys Ile Arg His	Asn Ile Glu Asp	Gly Ser		
		165	170	175		
15	Val Gln Leu Ala Asp	His Tyr Gln Gln	Asn Thr Pro Ile	Gly Asp Gly		
		180	185	190		
20	Pro Val Leu Leu Pro	Asp Asn His Tyr	Leu Ser Thr	Gln Ser Ala	Leu	
		195	200	205		
25	Ser Lys Asp Pro Asn	Glu Lys Arg Asp	His Met Val	Leu Leu Glu	Phe	
		210	215	220		
30	Val Thr Ala Ala Gly	Ile Thr Leu Gly	Met Asp Glu	Leu Tyr Lys		
		225	230	235		
35	<210> 31					
	<211> 1854					
	<212> ADN					
	<213> Artificial					
40	<220>					
	<223> GUS1381					
45	<400> 31					
	atggtagatc tgactagttt	acgtcctgta gaaaccccaa	cccgtgaaat caaaaaactc		60	
50	gacggcctgt gggcattcag	tctggatcgc gaaaactgtg	gaattgatca gcgttggtgg		120	
	gaaagcgcgt tacaagaaag	ccgggcaatt gctgtgccag	gcagttttta cgatcagttc		180	
	gccgatgcag atattcgtaa	ttatgcgggc aacgtctggt	atcagcgcga agtctttata		240	
55	ccgaaagggtt gggcaggcca	gcgtatcgtg ctgcgtttcg	atgcgggtcac tcattacggc		300	
	aaagtgtggg tcaataatca	ggaagtgatg gagcatcagg	gcggctatac gccatttgaa		360	
60	gccgatgtca cgccgtatgt	tattgccggg aaaagtgtac	gtatcacctg ttgtgtgaac		420	
	aacgaactga actggcagac	tatcccgccg ggaatggtga	ttaccgacga aaacggcaag		480	
	aaaaagcagt cttacttcca	tgatttcttt aactatgccg	gaatccatcg cagcgtaatg		540	
65	ctctacacca cgccgaacac	ctgggtggac gatatcacctg	tggtgacgca tgtcgcgcaa		600	
	gactgtaacc acgcgtctgt	tgactggcag gtgggtggcca	atggtgatgt cagcgttgaa		660	
70	ctgcgtgatg cggatcaaca	ggtggttgca actggacaag	gcactagcgg gactttgcaa		720	
75	gtgggtgaatc cgcacctctg	gcaaccgggt gaaggttatc	tctatgaact gtgcgtcaca		780	

ES 2 387 970 T3

gccaaaagcc agacagagtg tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca 840
 gtgaagggcc aacagttcct gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggtcgt 900
 5 catgaagatg cggacttacg tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac 960
 gcattaatgg actggattgg ggccaactcc taccgtacct cgcattaccc ttacgctgaa 1020
 10 gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc 1080
 ggctttcagc tgtcttttagg cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac 1140
 agcgaagagg cagtcaacgg ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg 1200
 15 atagcgcgtg acaaaaacca cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgcca cgaaccggat 1260
 acccgtccgc aaggtgcacg ggaatatattc gcgccactgg cggaagcaac gcgtaaactc 1320
 20 gacccgacgc gtccgatcac ctgctgcaat gtaatgttct gcgacgctca caccgatacc 1380
 atcagcgatc tctttgatgt gctgtgcctg aaccgttatt acggatggta tgtccaaagc 1440
 ggcgatttgg aaacggcaga gaaggtactg gaaaaagaac ttctggcctg gcaggagaaa 1500
 25 ctgcatcagc cgattatcat caccgaatac ggcgtggata cgtagccgg gctgcactca 1560
 atgtacaccg acatgtggag tgaagagtat cagtgtgcat ggctggatat gtatcaccgc 1620
 30 gtctttgatc gcgtcagcgc cgtcgtcggg gaacaggtat ggaatttcgc cgattttgcg 1680
 acctcgcaag gcatattgcg cgttggcggg aacaagaaag ggatcttcac tcgcgaccgc 1740
 aaaccgaagt cggcggcttt tctgctgcaa aaacgctgga ctggcatgaa cttcgggtgaa 1800
 35 aaaccgcagc agggaggcaa acaagctagc caccaccacc accaccacgt gtga 1854

40 <210> 32
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> GUS1381

<400> 32

50 Met Val Asp Leu Thr Ser Leu Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr Arg Glu
 1 5 10 15

55 Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu Asn
 20 25 30

Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser Arg
 35 40 45

60 Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala Asp

ES 2 387 970 T3

	50	55	60
5	Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val Phe Ile 65 70 75 80		
10	Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala Val 85 90 95		
15	Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu His 100 105 110		
20	Gln Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val Ile 115 120 125		
25	Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu Asn 130 135 140		
30	Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn Gly Lys 145 150 155 160		
35	Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Ile His 165 170 175		
40	Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp Asp Ile 180 185 190		
45	Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val Asp 195 200 205		
50	Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp Ala 210 215 220		
55	Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr Leu Gln 225 230 235 240		
60	Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Glu 245 250 255		
65	Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro Leu 260 265 270		
70	Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Gln Gln Phe Leu Ile 275 280 285		
75	Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu Asp Ala		

ES 2 387 970 T3

	290					295					300				
5	Asp 305	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly 310	Phe	Asp	Asn	Val	Leu 315	Met	Val	His	Asp 320
10	Ala	Leu	Met	Asp	Trp 325	Ile	Gly	Ala	Asn	Ser 330	Tyr	Arg	Thr	Ser	His 335
15	Pro	Tyr	Ala	Glu 340	Glu	Met	Leu	Asp	Trp 345	Ala	Asp	Glu	His	Gly 350	Ile
20	Val	Ile	Asp 355	Glu	Thr	Ala	Ala	Val 360	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser 365	Leu	Gly
25	Gly	Phe 370	Glu	Ala	Gly	Asn	Lys 375	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr 380	Ser	Glu	Ala
30	Val	Asn	Gly	Glu	Thr	Gln 390	Gln	Ala	His	Leu	Gln 395	Ala	Ile	Lys	Glu 400
35	Ile	Ala	Arg	Asp	Lys 405	Asn	His	Pro	Ser	Val 410	Val	Met	Trp	Ser	Ile 415
40	Asn	Glu	Pro	Asp 420	Thr	Arg	Pro	Gln	Gly 425	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe 430	Ala
45	Leu	Ala	Glu 435	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu 440	Asp	Pro	Thr	Arg	Pro	Ile	Thr 445
50	Val	Asn	Val	Met	Phe	Cys	Asp 455	Ala	His	Thr	Asp 460	Thr	Ile	Ser	Asp 465
55	Phe	Asp	Val	Leu	Cys	Leu 470	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Gly 475	Trp	Tyr	Val	Gln 480
60	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr 485	Ala	Glu	Lys	Val	Leu 490	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu 495
65	Trp	Gln	Glu	Lys 500	Leu	His	Gln	Pro	Ile 505	Ile	Ile	Thr	Glu	Tyr 510	Gly
70	Asp	Thr	Leu 515	Ala	Gly	Leu	His	Ser 520	Met	Tyr	Thr	Asp	Met 525	Trp	Ser
75	Glu	Tyr	Gln	Cys	Ala	Trp	Leu	Asp	Met	Tyr	His	Arg	Val	Phe	Asp

ES 2 387 970 T3

	530		535		540																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
--	-----	--	-----	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ES 2 387 970 T3

gactttgcaa gtggtgaatc cgcacctctg gcaaccgggt gaagggtatc tctatgaact 960
 gtgcgtcaca gccaaaagcc agacagagtg tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg 1020
 5 gtcagtggca gtgaagggcg aacagttcct gattaaccac aaaccgttct actttactgg 1080
 ctttggtcgt catgaagatg cggacttacg tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggc 1140
 10 gcacgaccac gcattaatgg actggattgg ggccaactcc taccgtaacct cgcattaccc 1200
 ttacgctgaa gagatgctcg actgggcaga tgaacatggc atcgtgggtga ttgatgaaac 1260
 tgctgctgtc ggctttaacc tctctttagg cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa 1320
 15 agaactgtac agcgaagagg cagtcaacgg ggaaactcag caagcgact tacaggcgat 1380
 taaagagctg atagcgcgtg acaaaaacca cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgcaa 1440
 20 cgaaccggat acccgctcgc aagtgcacgg gaatatctcg ccaactggcgg aagcaacgcg 1500
 taaactcgac ccgacgcgtc cgatcacctg cgtcaatgta atgttctgcg acgctcacac 1560
 cgataccatc agcgatctct ttgatgtgct gtgcctgaac cgttattacg gatgggtatgt 1620
 25 ccaaagcggc gatttgga aa cggcagagaa ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca 1680
 ggagaaactg catcagccga ttatcatcac cgaatacggc gtggatacgt tagccgggct 1740
 30 gcactcaatg tacaccgaca tgtggagtga agagtatcag tgtgcatggc tggatatgta 1800
 tcaccgcgtc tttgatcgcg tcagcgccgt cgtcgggtgaa caggtatgga atttcgccga 1860
 ttttgcgacc tcgcaaggca tattgcgcgt tggcggtaac aagaaaggga tcttcactcg 1920
 35 cgaccgcaaa ccgaagtcgg cggcttttct gctgcaaaaa cgctggactg gcatgaactt 1980
 cggtgaaaaa ccgcagcagg gaggcaaaca agctagccac caccaccacc accacgtgtg 2040
 40 a 2041

<210> 34
 <211> 617
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> GUS1391Z

50 <400> 34

Met Val Asp Leu Arg Val Asn Arg Arg Leu Val Arg Pro Val Glu Arg
 1 5 10 15

55

Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg Glu
 20 25 30

60

Asn Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu Ser

ES 2 387 970 T3

	35	40	45
5	Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp Ala 50 55 60		
10	Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val Phe 65 70 75 80		
15	Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp Ala 85 90 95		
20	Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met Glu 100 105 110		
25	His Gln Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr Val 115 120 125		
30	Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu Leu 130 135 140		
35	Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn Gly 145 150 155 160		
40	Lys Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly Ile 165 170 175		
45	His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp Asp 180 185 190		
50	Ile Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser Val 195 200 205		
55	Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg Asp 210 215 220		
60	Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr Leu 225 230 235 240		
65	Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr 245 250 255		
70	Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr Pro 260 265 270		
75	Leu Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe Leu		

ES 2 387 970 T3

				275					280							285
5	Ile	Asn	His	Lys	Pro	Phe	Tyr	Phe	Thr	Gly	Phe	Gly	Arg	His	Glu	Asp
		290					295					300				
10	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Lys	Gly	Phe	Asp	Asn	Val	Leu	Met	Val	His	Asp
	305					310					315					320
15	His	Ala	Leu	Met	Asp	Trp	Ile	Gly	Ala	Asn	Ser	Tyr	Arg	Thr	Ser	His
					325					330					335	
20	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Glu	Glu	Met	Leu	Asp	Trp	Ala	Asp	Glu	His	Gly	Ile
				340					345					350		
25	Val	Val	Ile	Asp	Glu	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly
			355					360					365			
30	Ile	Gly	Phe	Glu	Ala	Gly	Asn	Lys	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr	Ser	Glu	Glu
	370						375					380				
35	Ala	Val	Asn	Gly	Glu	Thr	Gln	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Ile	Lys	Glu
	385					390					395					400
40	Leu	Ile	Ala	Arg	Asp	Lys	Asn	His	Pro	Ser	Val	Val	Met	Trp	Ser	Ile
					405					410					415	
45	Ala	Asn	Glu	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Gln	Val	His	Gly	Asn	Ile	Ser	Pro
				420					425					430		
50	Leu	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Asp	Pro	Thr	Arg	Pro	Ile	Thr	Cys
			435					440					445			
55	Val	Asn	Val	Met	Phe	Cys	Asp	Ala	His	Thr	Asp	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu
	450						455					460				
60	Phe	Asp	Val	Leu	Cys	Leu	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Tyr	Val	Gln	Ser
	465					470					475					480
65	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Ala
					485					490					495	
70	Trp	Gln	Glu	Lys	Leu	His	Gln	Pro	Ile	Ile	Ile	Thr	Glu	Tyr	Gly	Val
				500					505					510		
75	Asp	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	His	Ser	Met	Tyr	Thr	Asp	Met	Trp	Ser	Glu

ES 2 387 970 T3

	515		520		525	
5	Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu Asp Met Tyr His Arg Val Phe Asp Arg					
	530		535		540	
10	Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn Phe Ala Asp Phe Ala					
	545		550		555	560
15	Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys Lys Gly Ile Phe					
		565		570		575
20	Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln Lys Arg					
		580		585		590
25	Trp Thr Gly Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gln Gly Gly Lys Gln					
		595		600		605
30	Ala Ser His His His His His His Val					
	610		615			
35	<210> 35					
	<211> 34					
	<212> PRT					
	<213> Artificial					
40	<220>					
	<223> Calcitocina de salmón					
45	<400> 35					
50	Lys Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu					
	1	5		10		15
55	Leu His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr					
		20		25		30
60	Pro Gly					
65	<210> 36					
	<211> 102					
	<212> ADN					
	<213> Artificial					
70	<220>					
	<223> Calcitocina de salmón					
75	<400> 36					
80	aagtgtctcca acctctctac ctgcgttctt ggtaagctct ctcaggagct tcacaagctc					60
85	cagacttacc ctagaaccaa cactgggttc ggtaccctg gt					102

ES 2 387 970 T3

<210> 37
 <211> 53
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> hEGF

 10 <400> 37

 Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
 1 5 10 15

 15 Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
 20 25 30

 20 Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
 35 40 45

 25 Trp Trp Glu Leu Arg
 50

 <210> 38
 <211> 162
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> hEGF

 35 <400> 38
 aactctgatt cagaatgccc actcagtcac gacggatatt gtcttcacga tgggggatgc 60
 atgtacatcg aggcccttgga caagtacgca tgtaattgtg tagtgggata cattggtgaa 120
 40 cgctgtcagt atcgagactt gaaatggtgg gagcttaggt ga 162

 <210> 39
 <211> 191
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> hGH

 <400> 39

 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 55 1 5 10 15

 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 60
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro

ES 2 387 970 T3

[illegible]

ES 2 387 970 T3

	cagacctaca gcaagttcga cacaaactca cacaacgatg acgcactact caagaactac	480
	gggctgctct actgcttcag gaaggacatg gacaaggteg agacattcct gcgcacgtg	540
5	cagtgccgct ctgtggaggg cagctgtggc ttctga	576
10	<210> 41 <211> 53 <212> PRT <213> Artificial	
15	<220> <223> hEGF	
	<400> 41	
20	Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His 1 5 10 15	
25	Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn 20 25 30	
30	Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys 35 40 45	
	Trp Trp Glu Leu Arg 50	
35	<210> 42 <211> 162 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> hEGF	
	<400> 42	
45	aactctgatt cagaatgcc actcagtcac gacggatatt gtcttcacga tggggatatgc	60
	atgtacatcg aggcccttga caagtacgca tgtaattgtg tagtgggata cattgggtgaa	120
	cgctgtcagt atcgagactt gaaatgggtgg gagcttaggt ga	162
50	<210> 43 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido 22aZ-5'	
	<400> 43	
60	gaggatccgc atggctacca agatattage cct	33

ES 2 387 970 T3

<210> 44
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido 22aZ-3'
 <400> 44
 10 cattcatgat tccgccacct ccaccaaaga tggcacctcc aacgatgg 48
 <210> 45
 <211> 42
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido Rice13Prol-5'
 20
 <400> 45
 gagtcgacgg atccatgaag atcattttcg tctttgctct cc 42
 <210> 46
 <211> 51
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido Rice13Prol-3'
 30
 <400> 46
 catccatggt tccgccacct ccacccaaga caccgccaag ggtggtaatg g 51
 35
 <210> 47
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia consenso 1 de las repeticiones en tandem en gliadinas
 45 <400> 47
 Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln
 1 5
 50
 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia consenso de las repeticiones en tandem en gliadinas
 <400> 48
 60
 Pro Gln Gln Gln Pro Pro Phe Ser
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia consenso 3 de las repeticiones en tandem en gliadinas
 <400> 49
 10
 Pro Gln Gln Pro Gln
 1 5
 15
 <210> 50
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> cebador GFP 5'
 <400> 50
 aattcatgag cagtaaagga gaagaacttt tcac 34
 25
 <210> 51
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador GFP 3'
 35
 <400> 51
 attggatcct cattatttgt atagttcatc catgc 35
 40
 <210> 52
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> cebador RTB5
 <400> 52
 aattcatgag cagtaaagga gaagaacttt tcac 34
 50
 <210> 53
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador RTB3
 <400> 53
 60 ttaccattat tttgataccc gggaag 26
 <210> 54
 <211> 39

ES 2 387 970 T3

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> cebador SPfor	
	<400> 54	
	cagtcgacac catgaggggtg ttgctcggtg ccctcgctc	39
10	<210> 55	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> RX3ECP3'	
	<400> 55	
20	ggtggatccc tagaatccat ggtctggcac	30
	<210> 56	
	<211> 44	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador RX3G5ECP3'	
30	<400> 56	
	ggtggatccc tagagccacc gccacctcca tccatggtct ggca	44
35	<210> 57	
	<211> 1580	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> fragment de ADN HindIII/XbaI en el plásmido pEGFP-N1	
	<400> 57	
	aagcttcgaa ttctgcagtc gacaacatgg ctaccaagat attagccctc cttgcgcttc	60
45	ttgccctttt tgtgagcgca acaaatgcgt tcattattcc acaatgctca cttgctocta	120
	gtgccattat accacagttc ctcccaccag ttacttcaat gggcttcgaa cacctagctg	180
50	tgcaagccta caggctacaa caagcgcttg cggcaagcgt cttacaacaa ccaattaacc	240
	aattgcaaca acaatccttg gcacatctaa ccatacaaac catcgcaacg caacagcaac	300
	aacagttcct accagcactg agccaactag atgtggtgaa ccctgtcgcc tacttgcaac	360
55	agcagctgct tgcattcaac ccacttgctc tggcaaacgt agctgcatac caacaacaac	420
	aacaattgca gcagtttctg ccagcgctca gtcaactagc catggtgaac cctgccgcct	480
60	acctacaaca gcaacaactg ctttcatcta gccctctcgc tgtgggtaat gcacctacat	540
	acctgcaaca acaattgctg caacagattg taccagctct gactcagcta gctgtggcaa	600

ES 2 387 970 T3

	accctgctgc ctacttgcaa cagctgcttc cattcaacca actgactgtg tcgaactctg	660
	ctgcgtagct acaacagcga caacagttac ttaatccact agaagtgcc aacccattgg	720
5	tcgctgcctt cctacagcag caacaattgc taccatacag ccagttctct ttgatgaacc	780
	ctgccttgtc gtggcagcaa cccatcggtg gaggtgccat ctttggtgga ggtggcgga	840
10	tcatggtgag caagggcgag gagctgttca ccgggggtgg gcccatcctg gtcgagctgg	900
	acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct	960
	acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca	1020
15	ccctcgtagc caccctgacc tggggcgctgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga	1080
	agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct	1140
20	tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgcgaggt gaagtctgag ggcgacacct	1200
	tgggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc	1260
	acaagctgga gtacaactac atcagccaca acgtctatat caccgccgac aagcagaaga	1320
25	acggcatcaa ggccaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg	1380
	ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc	1440
30	actacctgag caccagtcg gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg	1500
	tcctgctgga gttcgtgacc gccgcgggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt	1560
	aaagcggccg cgactctaga	1580
35	<210> 58 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador ECFP Ncol 5'	
	<400> 58	
45	gtaccatggt gagcaagggc gaggagctg	29
	<210> 59 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador ECFPN1 BamNotSac 3'	
55	<400> 59	
	gcagagctcg cggccgcgga tccttacttg tacagctcgt ccatgccg	48
60	<210> 60 <211> 24 <212> ADN	

ES 2 387 970 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador mCherry Rcal 5'	
5	<400> 60 atcatgatgg tgagcaaggg cgag	24
10	<210> 61 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador RX3STOP3'	
20	<400> 61 tcggatcctt ctagaatcat caggtct	27
25	<210> 62 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador 5'DNAb <400> 62 agccatggcg cgagtcggga gctatctctg	30
35	<210> 63 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador 3'DNAb <400> 63 gttgtgtaca atgatgtcat tcg	23
45	<210> 64 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador DNAb-hGH	
55	<400> 64 gaatgacatc attgtacaca acttcccaac cattccotta tcc	43
60	<210> 65 <211> 40 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador 3' hGH	

ES 2 387 970 T3

	<400> 65	
	atggtaccac gcgtcttata agaagccaca gctgccctcc	40
5		
	<210> 66	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> cebador IM-for	
	<400> 66	
15	atcattgtac acgccttccc aaccattccc ttatcc	36
	<210> 67	
	<211> 35	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador IM-rev	
25		
	<400> 67	
	tcaggatcct tatcagaagc cacagctgcc ctcca	35
30	<210> 68	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador Casp3 directo	
	<400> 68	
40	gactcatgat cgatgagggtg gacatggaga aactgaaaa ctacg	45
	<210> 69	
	<211> 49	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador Casp3 inverso	
50	<400> 69	
	ctgggtacca tgtctagatc attagtata aaaatagagt tcttttgtg	49
	<210> 70	
55	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> cebador Casp2 directo	
	<400> 70	
	gactcatgat cgatgagcac gacggctctc tctgccttca ggt	43

ES 2 387 970 T3

5	<210> 71		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador Casp2 inverso		
10	<400> 71		
	ctgggtacca tgtctagata atcatgtggg aggggtgtcct ggg		43
15	<210> 72		
	<211> 1148		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> fragmento de ADN NheI/HindIII en pcDNA3.1(-)		
	<400> 72		
	gctagcggtt aaacggggccc tctagactcg acaccatgag ggtgttgctc gttgccctcg		60
25	ctctcctggc tctcgctgcg agcgccacct ccacgcatac aagcggcggc tgcggctgcc		120
	agccaccgcc gccggttcat ctaccgcgcg cggtgcatct gccacctccg gttcacctgc		180
	cacctccggt gcatctccca ccgcccgtcc acctgccgcc gccgggtccac ctgccaccgc		240
30	cgggtccatgt gccgcccgcg gttcatctgc cgcccgcacc atgccactac cctactcaac		300
	cgccccggcc tcagcctcat ccccagccac acccatgccc gtgccaacag ccgcatccaa		360
35	gcccgtgcca aaggcgcgcc ggtggaggcg gaggtacat gattgagggt aggattgttg		420
	gtggaagtga ttcccgtgaa ggtgcttggc cttgggttgt ggctctttat ttcgatgac		480
	agcaagtttg tggagcctcc cttgtttcta gagattggct tgtgtctgct gcacattgcg		540
40	tgtatggaag aaatatggaa ccaagtaagt ggaaggcagt tcttggattg catatggctt		600
	caaatcttac aagtccacag attgaaactc gtctcatcga tcaaattggt atcaaccac		660
45	actataacaa gaggagaaaa aacaatgata ttgctatgat gcatcttgag atgaaagtga		720
	actacacaga ttacattcag ccaatttgtc ttccagagga aaaccaagtt ttcccacctg		780
	gaaggatttg ttctattgcc ggttggggag cacttatcta tcaaggatca actgcagatg		840
50	ttcttcaaga agcagatggt ccacttttgt caaatgagaa atgccaacag caaatgcctg		900
	agtataacat tactgagaat atgggtgtgtg ctggatacga ggcaggaggt gtggattcct		960
55	gtcagggaga ttctggaggt cctcttatgt gccaggagaa taacagatgg ctttttagccg		1020
	gagttacttc tttcggatac caatgcgcac tgccaaatag acctggtgtg tatgctagag		1080
	ttccaaggtt tacagagtgg attcaatcat ttctacattg ataaggatcc gagctcggta		1140
60	ccaagctt		1148

ES 2 387 970 T3

<210> 73
<211> 18
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador bGH inverso

10 <400> 73
cctcgactgt gccttcta 18

<210> 74
15 <211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> cebador bGH inverso2

<400> 74
cctctagact cgacccatgg tgagcaaggg cgaggag 37

25

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna o inóculo que comprende una cantidad inmunogénica eficaz de ensamblajes similares a cuerpos proteicos recombinantes (RPBLA) que contienen una proteína de fusión recombinante disuelta o dispersa en un diluyente farmacológicamente aceptable, dicha proteína de fusión recombinante contiene dos secuencias unidas entre sí en la que una secuencia es una secuencia inductora de cuerpos proteicos (PBIS) y la otra es un polipéptido inmunogénico biológicamente activo contra el que se va a inducir una respuesta inmunológica mediante dicha vacuna o inóculo, en donde la PBIS es la de un compuesto de prolamina para su uso en la generación de una respuesta inmune de células B o células T en un animal huésped contra el polipéptido inmunogénico.
5
10
2. La vacuna o inóculo según la reivindicación 1 en donde dicha proteína de fusión incluye además una secuencia enlazadora entre la secuencia inductora de cuerpos proteicos y la secuencia del polipéptido inmunogénico biológicamente activo.
15
3. La vacuna o inóculo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto de prolamina es gamma-zeína, alfa-zeína, gamma-gliadina o prolamina de arroz.
4. La vacuna o inóculo según la reivindicación 3, en donde el compuesto de prolamina es la secuencia RX3 de gamma-zeína.
20

Figura 1

Fig. 1A

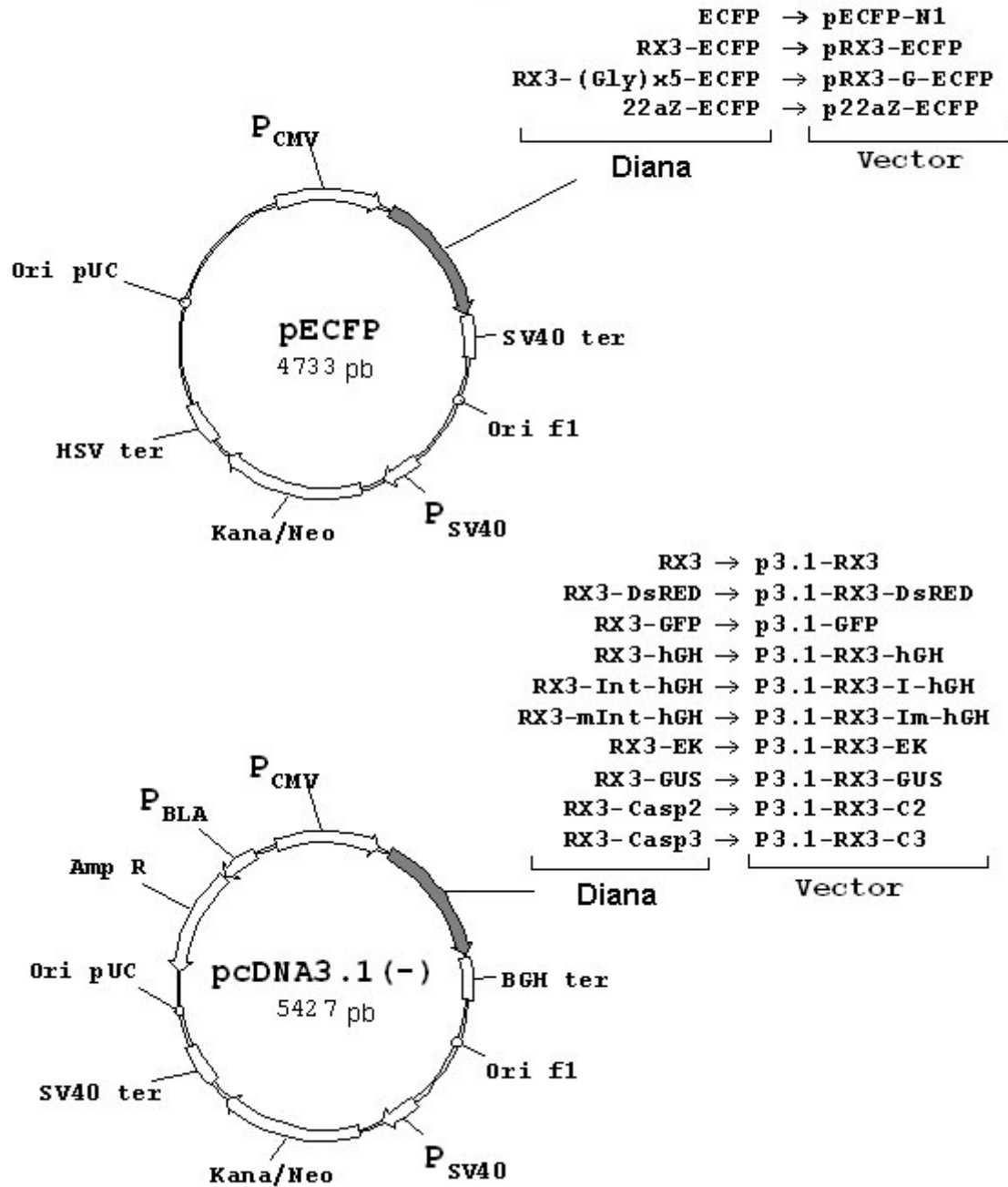


Figura 1

Fig 1B

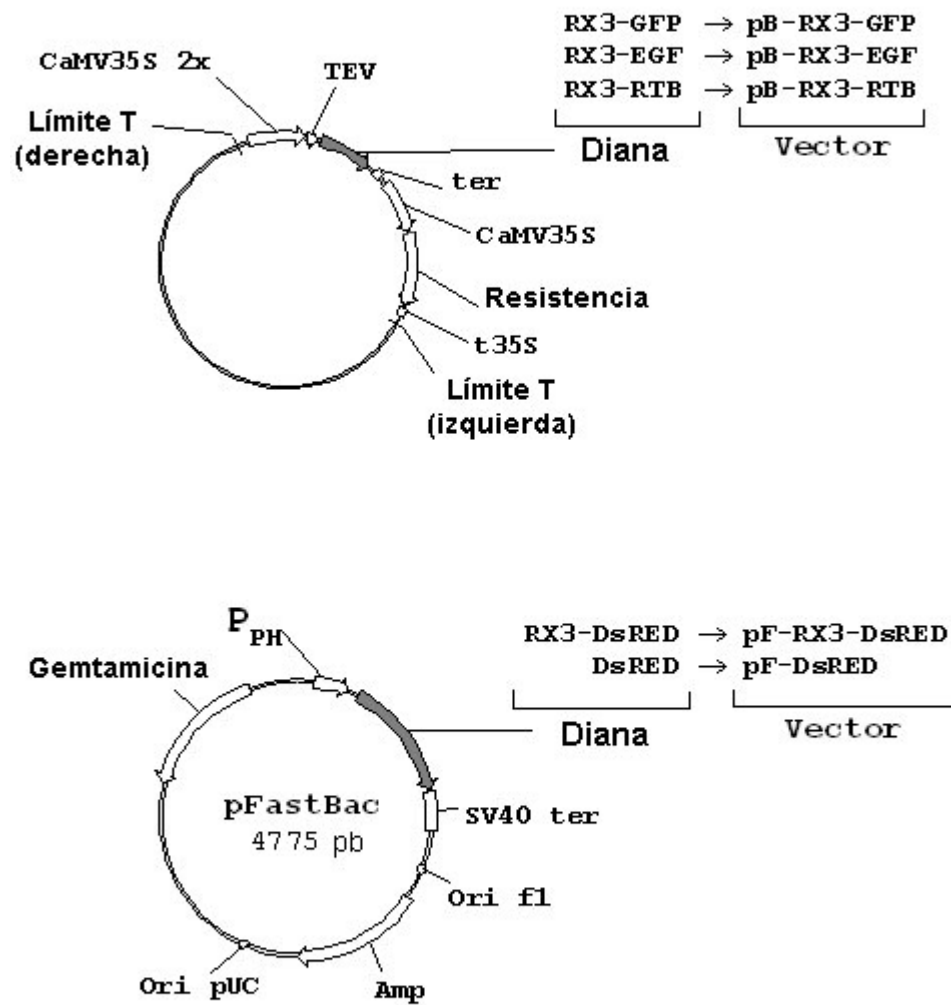


Figura 2

Fig 2A

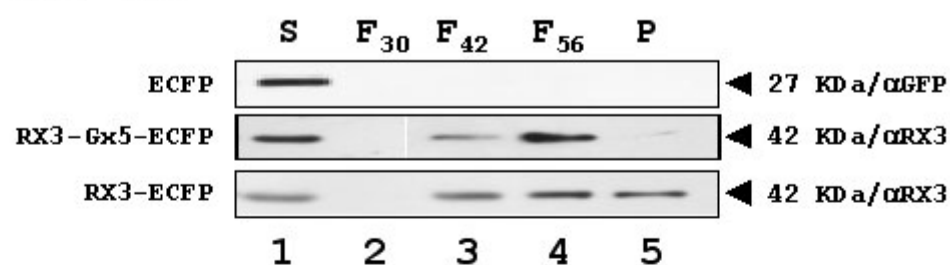


Fig 2B

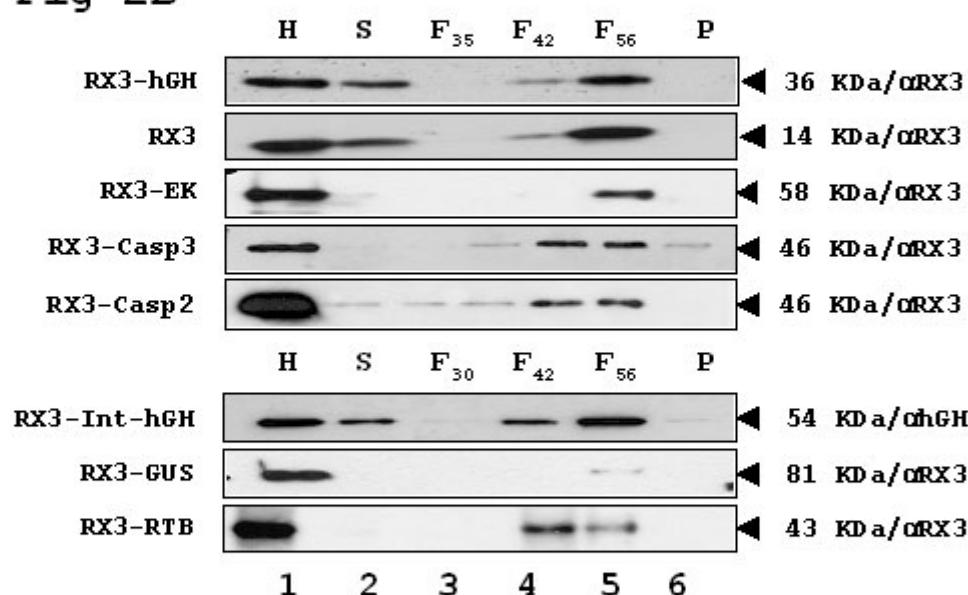


Fig 2C

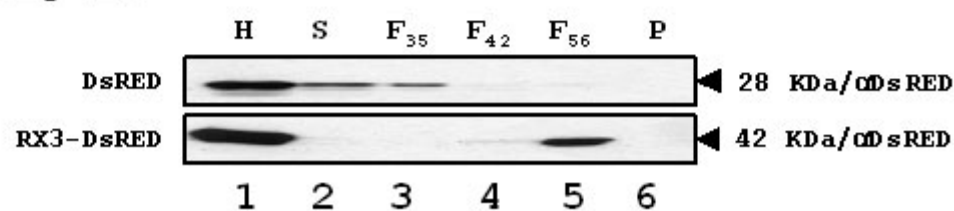


Figura 3

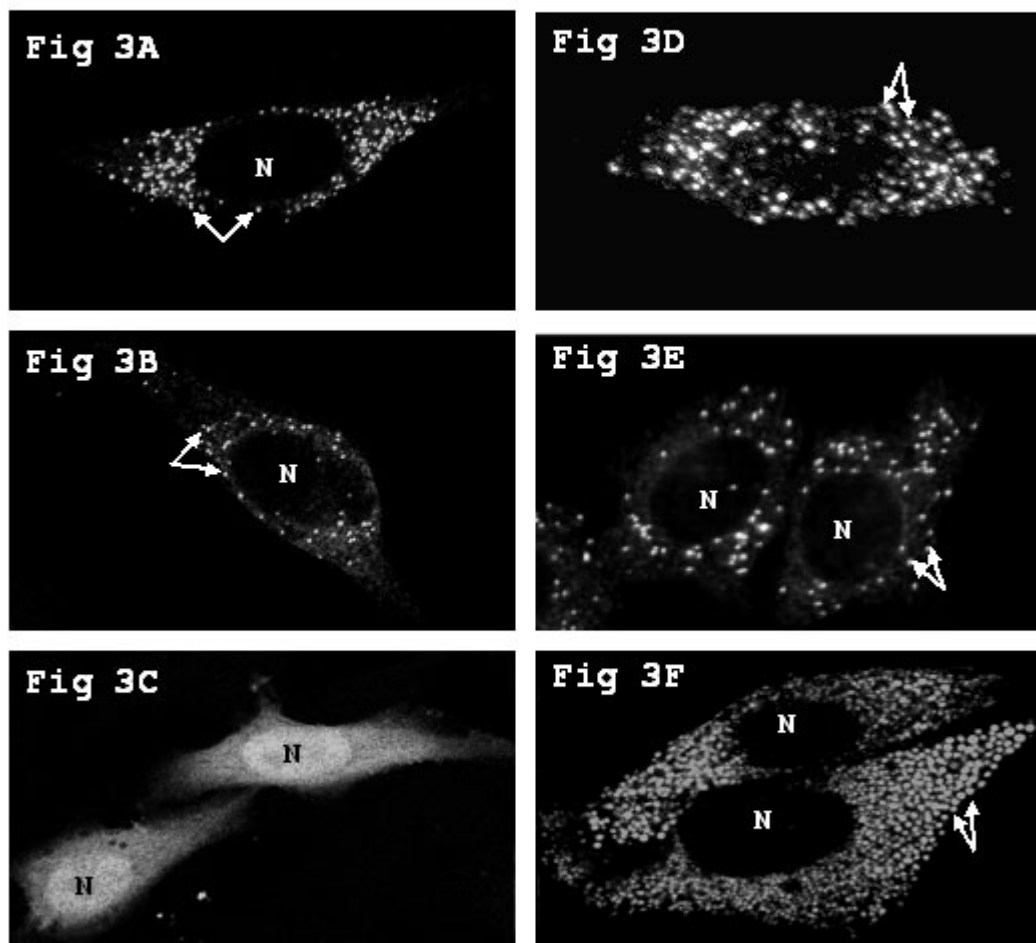


Figura 4

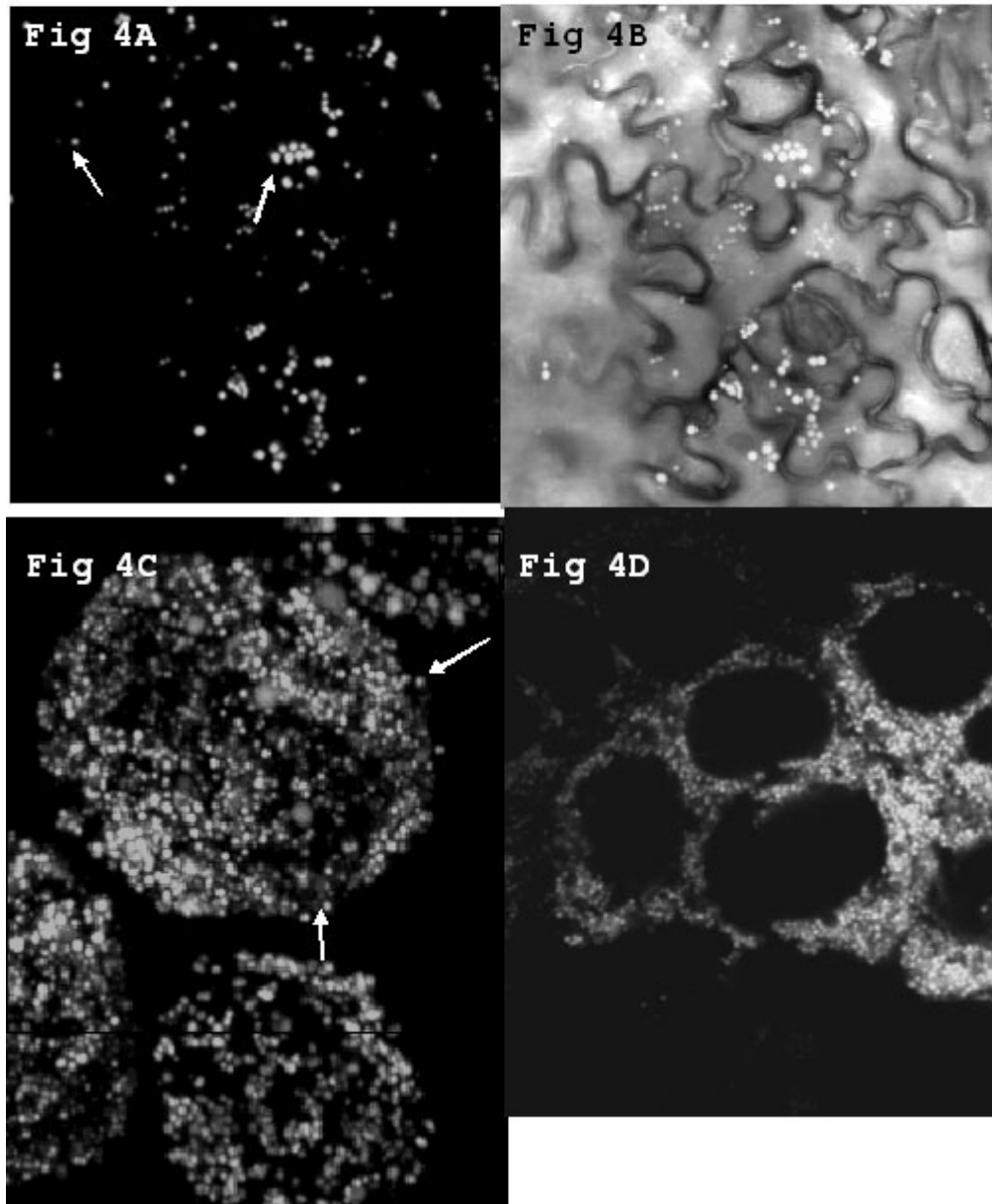


Figura 5

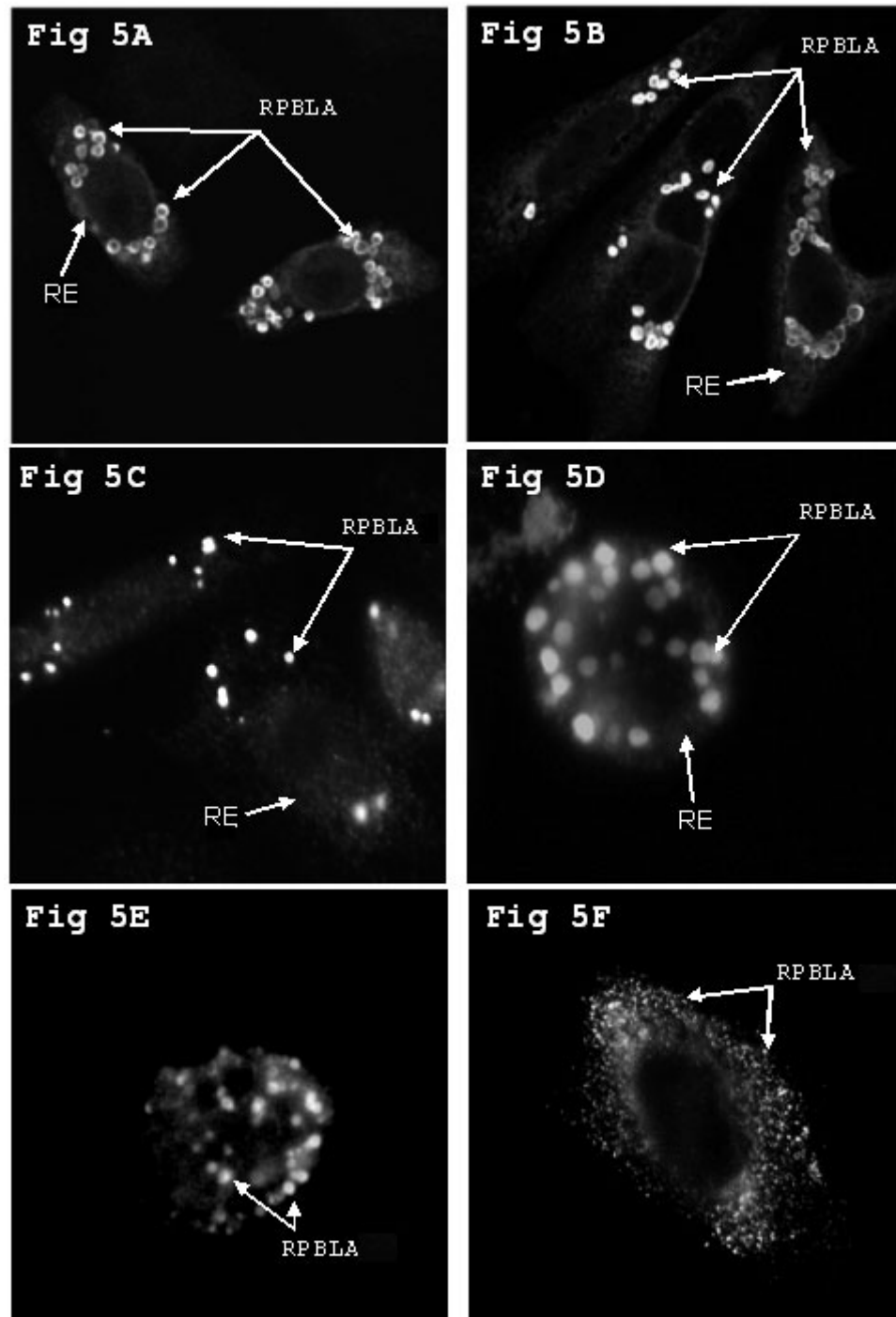


Figura 6

Fig 6A

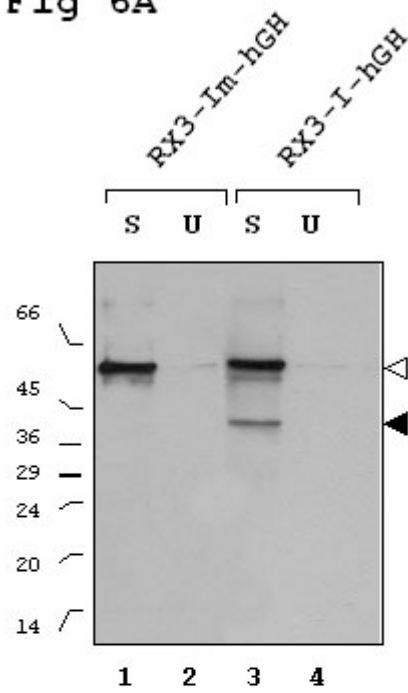


Fig 6B

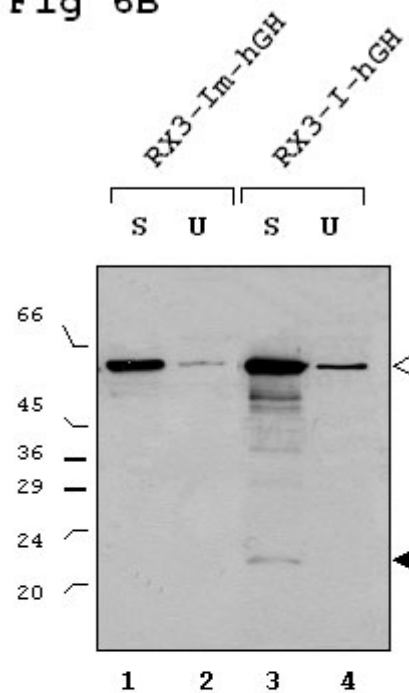


Fig 6C

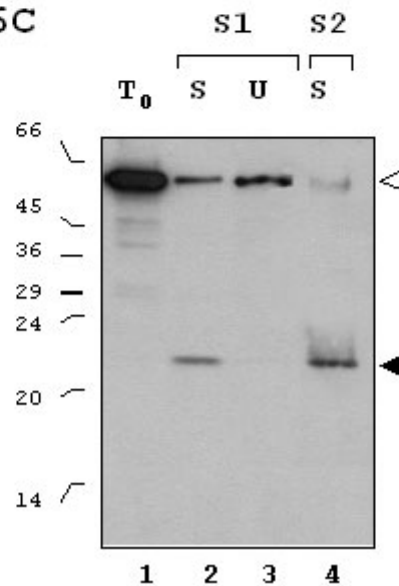


Figura 7

Fig 7A

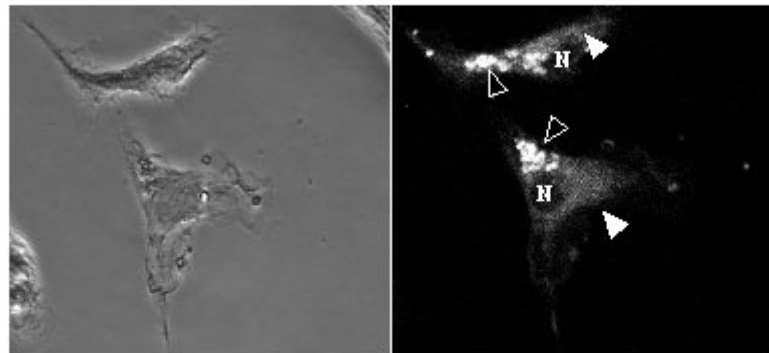


Fig 7B

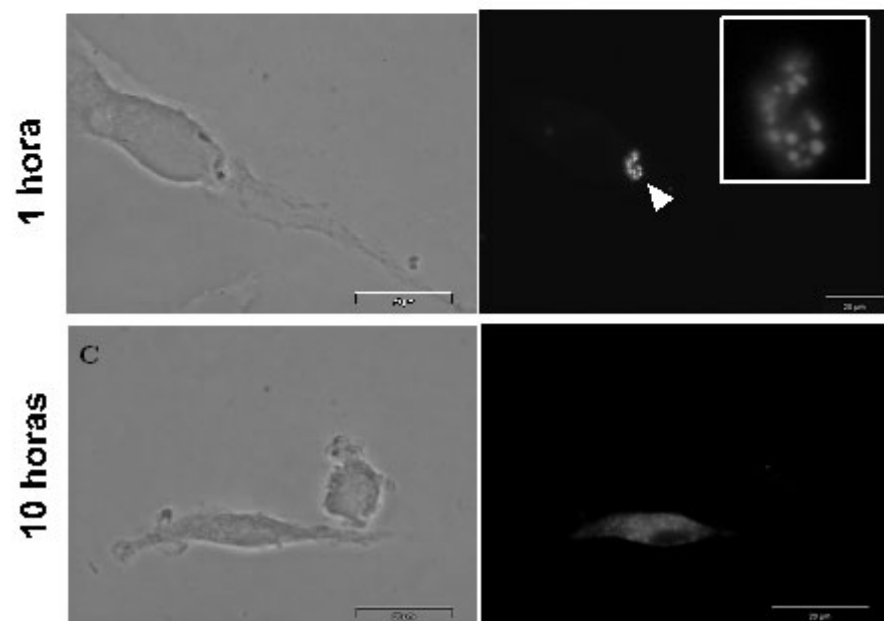


Figura 8

Fig 8A

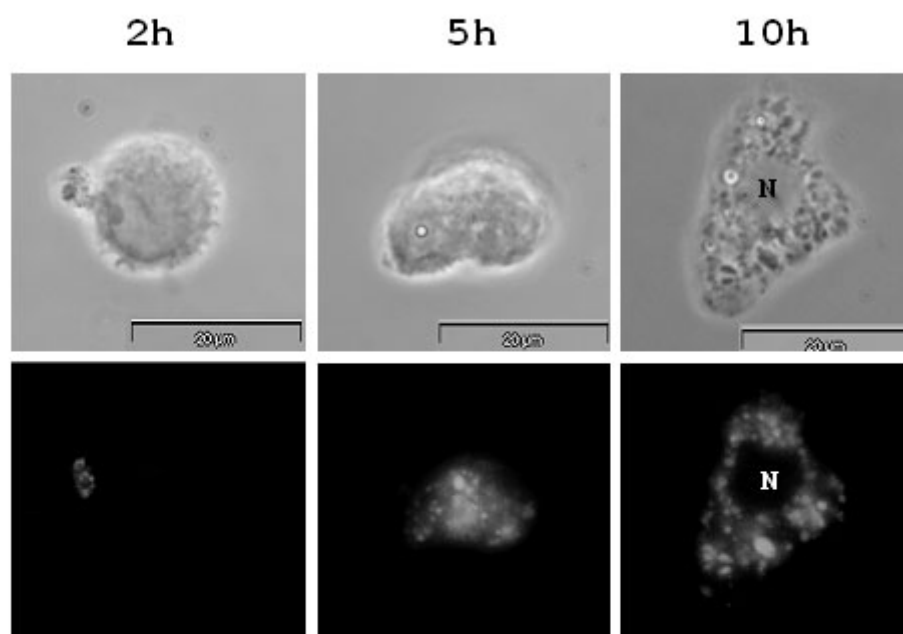


Fig 8B

