

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 641**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2004 E 04776107 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1664322**

54 Título: **Molécula vehículo recombinante para la expresión, el suministro y la purificación de polipéptidos diana**

30 Prioridad:

22.05.2003 US 472495 P

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

31.10.2013

73 Titular/es:

**IBIO, INC. (100.0%)
9 Innovation Way, Suite 100
Newark, DE 19711, US**

72 Inventor/es:

**YUSIBOV, VIDADI;
METT, VADIM y
MUSIYCHUK, KONSTANTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 427 641 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula vehículo recombinante para la expresión, el suministro y la purificación de polipéptidos diana

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/472.495 presentada el 22 de mayo de 2003.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la expresión, purificación y biología molecular de proteínas. Específicamente, la presente invención se refiere a la expresión de una proteína vehículo en la cual se usa un polipéptido maduro de una enzima termoestable como molécula vehículo para la producción, recuperación y suministro de polipéptidos diana. La molécula vehículo es útil para la producción de secuencias foráneas en diferentes sistemas de expresión y huéspedes incluyendo plantas y cultivos celulares de mamífero.

Antecedentes de la invención

Las vacunas son el medio más eficaz para prevenir e incluso eliminar enfermedades infecciosas. Aunque existen varias vacunas eficaces basadas en patógenos completos, es importante el desarrollo de vacunas más seguras, más potentes y rentables basadas en partes de patógeno (vacunas de subunidad). Durante las últimas dos décadas se han desarrollado varias aproximaciones para la expresión (bacteriana, de levadura, cultivo celular de mamífero y plantas) y suministro (ADN, vectores de virus vivo, proteínas purificadas, partículas víricas vegetales) de antígenos de vacuna. Todas estas aproximaciones tienen impacto significativo sobre el desarrollo y ensayo de vacunas candidatas recién desarrolladas. Sin embargo, existe la necesidad de mejorar los sistemas de expresión y suministro para crear vacunas más eficaces pero más seguras con menos efectos secundarios. Algunas de las características deseadas de las vacunas futuras son (a) que sean altamente eficaces (que estimulen ambos brazos del sistema inmune), (b) que tengan composición genética conocida y controlada, (c) que tengan eficacia temporal del sistema, (d) que sean adecuadas para la expresión tanto de péptidos de tamaño pequeño como de polipéptidos de tamaño grande, (e) que sean adecuadas para la expresión en diferentes sistemas (bacterias, levaduras, cultivos celulares de mamífero, vectores de virus vivo, vectores de ADN, plantas transgénicas y vectores de expresión transitoria), y (f) que sean capaces de formar estructuras tales como agregados y partículas tipo virus que sean fáciles de recuperar y sean inmunogénicas.

Por tanto, existe la necesidad de nuevas moléculas vehículo para el diseño por ingeniería, desarrollo y suministro de vacunas eficaces de subunidad. Estas moléculas vehículo deben proporcionar ventajas y flexibilidad para: expresar cantidades comercialmente suficientes de polipéptidos diana en diferentes sistemas, recuperación económica de polipéptidos diana del material fuente, acomodar polipéptidos de diferente tamaño (4 aminoácidos y mayores), acomodar repeticiones en tándem de polipéptidos diana, proporcionar función inmune potenciada, usar como herramienta de selección de alto rendimiento, y usar como herramienta de suministro para antígenos de vacuna y marcadores de enfermedad.

Sumario de la invención

En la presente invención, se ha descubierto una nueva proteína recombinante. Servirá como molécula vehículo para la expresión y recuperación de polipéptidos diana útiles para su uso como agentes terapéuticos o preventivos contra enfermedades infecciosas o incluso cáncer. La molécula vehículo descubierta en el presente documento puede acomodar polipéptidos de tamaños variables (de 4 aminoácidos a una proteína de 100 kD y superior) (polipéptidos diana) y puede expresarse en diferentes sistemas. Los polipéptidos diana pueden ser antígenos de vacuna.

En un aspecto general, la presente invención proporciona una molécula vehículo recombinante que tiene un polipéptido maduro modificado de una enzima termoestable que carece de uno o más segmentos de aminoácidos o un polipéptido maduro sustancialmente completo de la enzima termoestable adecuada para su fusión con un polipéptido heterólogo en cada uno de los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido maduro, y opcionalmente en la región bucle. El polipéptido maduro modificado y el polipéptido maduro sustancialmente completo retienen su termoestabilidad y/o actividad enzimática. El polipéptido maduro está modificado de tal modo que carece de una región bucle o tiene una región bucle alterada, o tiene al menos un sitio de restricción en la región bucle no presente de forma natural en la enzima termoestable de tipo silvestre.

En una realización preferida, la molécula vehículo descubierta en el presente documento se basa en el gen de la liquinasa B (*licB*) de *Clostridium thermocellum* (acceso: X63355, [gi:40697]). Se ha descubierto que esta enzima bacteriana termoestable puede usarse como molécula vehículo para producir polipéptidos diana. Tiene estructura de bucle expuesta en la superficie que está localizada lejos del dominio activo. Se ha descubierto que esta estructura de bucle puede usarse para la inserción de polipéptidos diana. Los polipéptidos diana pueden expresarse como fusiones N o C terminales o fusiones internas y/o como insertos dentro de la estructura de bucle. La proteína modificada se expresa y caracteriza por cualquiera de los parámetros tales como termoestabilidad, pH y condiciones de temperatura para la actividad óptima. La proteína modificada por ingeniería retenía su pH y condiciones de temperatura para la actividad óptima. Tampoco cambiaba su termoestabilidad a 65 °C.

Por consiguiente, la presente invención desvela una molécula recombinante derivada de una enzima termoestable para su uso como vehículo para diversos polipéptidos diana heterólogos (por ejemplo, vacunas, hormonas, anticoagulantes, inmunoglobulinas, interferones, interleuquinas, factores de crecimiento hematopoyéticos, etc.). En realizaciones específicas, desvela Rec LicB y LicKM. La proteína vehículo (es decir, Rec LicB o LicKM modificada o diseñada por ingeniería ligada a uno o más polipéptidos diana heterólogos) es una proteína de fusión y puede expresarse en sistemas procariontes o eucariotes. Específicamente, se ha descubierto que estas moléculas vehículo pueden acomodar polipéptidos de tamaño pequeño a grande de hasta 100 kD y más, pueden acomodar repeticiones en tándem del mismo polipéptido, pueden expresarse en diferentes sistemas, incluyendo bacterias, levaduras, baculovirus, cultivos celulares de mamífero, plantas, ADN y vectores virales, pueden proporcionar ventajas económicas para la recuperación del producto diana debido a su termoestabilidad o capacidad para formar agregados, pueden usarse como sistema de alto rendimiento para seleccionar polipéptidos diana; antígenos, marcadores de enfermedad u otros polipéptidos terapéuticos.

La presente invención también desvela un procedimiento para expresar péptidos como proteínas de fusión, usando un polipéptido maduro recombinante de una enzima termoestable como vehículo para el polipéptido o polipéptidos heterólogos y usando los procedimientos de expresión de péptidos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. A: Representación esquemática de la modificación por ingeniería de la molécula vehículo LicKM recombinante. 1 es la estructura de bucle. A indica la región cadena arriba de la estructura de bucle. C indica la región cadena abajo de la estructura de bucle. Para crear LicKM, el gen que codifica Lic B se dividió en la región bucle y se ensambló como se muestra. Se crearon sitios de clonación únicos durante la modificación por ingeniería. La secuencia de ácido nucleico para la molécula modificada por ingeniería LicKM (SEC ID N°:1) se muestra en la parte B de la figura. La división se hizo por PCR usando cebadores específicos. La PCR produjo 2 subclones (fig. 1A) denominados A (159 nucleótidos, 364 a 522) y C (486 nucleótidos, 523 a 1009). En el clon final el fragmento A se clonó cadena abajo del fragmento C conservando la composición original de aminoácidos.

La Figura 1C muestra la construcción de Rec LicB a partir de LicB de tipo silvestre. La Rec LicB consta de la proteína madura sin el dominio de unión a celulosoma. Las secuencias diana pueden fusionarse al extremo N y C así como en la estructura de bucle usando sitios de restricción BamHI y BglIII.

La Figura 1D muestra la secuencia de ácido nucleico para la molécula modificada por ingeniería Rec LicB (SEC ID N°:2).

La Figura 1E muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:3) codificada por el ácido nucleico de LicKM (SEC ID N°:1).

La Figura 1F muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:4) codificada por Rec LicB (SEC ID N°:2).

La Figura 1G muestra la secuencia de ácido nucleico para una variante de la molécula vehículo LicKM (SEC ID N°:5). También tiene un sitio de restricción KpnI creado en el extremo 5' y el sitio de restricción XhoI creado en el extremo 3' y el sitio BamHI/Bgl en la región bucle.

La Figura 1H muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°:6) codificada por una variante de la molécula vehículo LicKM (SEC ID N°:5).

Figura 2. Representación esquemática de la clonación de GFP en la estructura de bucle de Rec LicB para obtener LicB-GFP recombinante. La región codificante de GFP se amplificó por PCR y se clonó en la fase de lectura abierta de LicB.

La clonación se hizo en dos etapas por PCR. Usando los cebadores mostrados en la leyenda de la fig. 1, se crearon 2 subclones, A y C. Después se amplificaron por PCR las secuencias que codifican GFP (durante PCR en los extremos 5' y 3', se incorporaron sitios de restricción BamHI y BglIII, respectivamente). Posteriormente, usando los sitios BamHI y BglIII introducidos, se ligaron los 3 fragmentos como A-GFP-C para obtener LicB-GFP. Los cebadores para GFP fueron:

Más: 5'gtag gga tcc atg gtc agc aag ggc gag3' (SEC ID N°:7)

Menos: 5'gtag aga tct ctt gta cag ctc gtc cat3' (SEC ID N°:8)

Figura 3. Zimograma de la actividad liquescente en bacterias y extractos de levadura detectada en presencia de liquescente al 0,1 % como sustrato. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %. El gel se cargó con proteínas extraídas de *E. coli* cepa XL-1 blue [C control, LicB (tipo silvestre), LicKM (molécula vehículo modificada por ingeniería) y LicB-GFP recombinante (E)] y *Saccharomyces cerevisiae* cepa YPH 857 (LicB-GFP (Y)).

Figura 4. Representación esquemática de la clonación de polipéptidos diana en la molécula vehículo modificada por ingeniería LicKM. Se amplificaron por PCR fragmentos de ADN que codifican los polipéptidos diana de proteína G de virus sincitial respiratorio (RSV), proteína fluorescente verde (GFP) de medusa, e interferón α humano (IFN α) y se insertaron en la fase de lectura abierta de LicKM.

Figura 5. A es un zimograma de la actividad liquescente en extractos bacterianos detectada en presencia de liquescente al 0,1 % como sustrato. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %. El gel se cargó con proteínas extraídas de *E. coli* cepa XL-1 blue. C es un control negativo. LicKM es la molécula vehículo

modificada por ingeniería. LicKM-RSV, LicKM-GFP, y LicKM-IFN α son proteínas modificadas por ingeniería que contienen el polipéptido diana respectivo. B muestra los resultados del análisis de transferencia de Western. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %, se sometieron a electrotransferencia en membrana de nailon y se hicieron reaccionar con anticuerpos monoclonales específicos para el péptido de la proteína G de RSV. Los anticuerpos reaccionaron con LicKM-RSV, el control positivo de RSV (RSV (C+)) y la proteína de envuelta vírica de plantas que contiene el péptido idéntico (RSV (planta)). Los extractos de LicKM que no contenían péptido diana no tenían especificidad para los anticuerpos contra RSV.

Figura 6. Respuesta de anticuerpo (IgG) sérico específico de péptido G de RSV de ratones inmunizados i.p. con LicKM-RSV. Las respuestas de anticuerpo sérico se midieron por ELISA en placas recubiertas con partículas AIMV recombinantes que contenían péptido idéntico (aminoácidos 171 a 191) de la proteína G de RSV. Los datos representan valores de DO₄₉₀ obtenidos usando suero pre-inmune (LicKM-RSV Pre) y suero después de la tercera dosis (LicKM-RSV Final) de antígeno. Los números 1, 2, 3, y 4 indican animales individuales.

Figura 7. Detección de LicKM-F200 de forma enzimática (A) y serológica (B) por análisis de Western. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %. A es un zimograma de la actividad liquenasa en extractos vegetales detectada en presencia de liquenano al 0,1 % como sustrato. LicKM-F200 (F200) reaccionó con anticuerpos específicos para LicKM. Ambos procedimientos detectaron proteína del tamaño esperado (47 kD).

Figura 8. Respuesta de anticuerpo (IgG) sérico específico de proteína F de RSV de ratones inmunizados i.p. con LicKM-F200. La respuesta de anticuerpo sérico se midió por ELISA usando placas recubiertas con la cepa inactivada RSV Long. Los datos representan valores de DO₄₉₀ obtenidos usando suero pre-inmune (LicKM-F200 Pre) y suero después de la tercera dosis (LicKM-F200 Final) de antígeno. Los números 1, 2, 3, y 4 indican muestras de suero pre y post-inmune recogidas de animales individuales.

Figura 9. Análisis de transferencia de Western de LicKM-PAD4 recombinante. Las proteínas se separaron de forma electroforética (gel de SDS-poliacrilamida al 12 %), se transfirieron a una membrana, y se hicieron reaccionar con diferentes anticuerpos. Todos los anticuerpos específicos para PA, incluyendo el anticuerpo monoclonal 14B7 reconocieron LicKM-PAD4 o PA de control. AIMV CP o LicKM, usados como controles negativos, no reaccionaron con ninguno de los anticuerpos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que formas recombinantes de ciertas enzimas termoestables pueden usarse como vehículos o moléculas vehículo para la expresión, estabilización, presentación, purificación y/o suministro de diversos polipéptidos fusionados genéticamente de interés (polipéptidos diana) tales como antígenos de vacuna, enzimas, anticuerpos (cadena sencilla) y polipéptidos terapéuticos.

La presente invención desvela, entre otras cosas, (i) diversas moléculas vehículo termoestables derivadas de enzimas termoestables y proteínas vehículo que contienen polipéptido heterólogo, (ii) construcciones de ácido nucleico, que pueden codificar molécula vehículo recombinantes y proteínas vehículo de la invención, y células y organismos transformados con construcciones de expresión de la proteína vehículo, (iii) procedimientos para producir antígenos de vacuna en células y organismos; (iv) procedimientos para estimular una respuesta inmune en animales y seres humanos, estando dirigida la respuesta inmune a una proteína vehículo, específicamente hacia el antígeno diana de la presente invención, (v) procedimientos para inducir respuestas humorales y celulares contra agentes infecciosos usando una proteína de fusión vehículo descrita a continuación, y (vi) procedimientos para producir diversas enzimas industriales (diferentes de las enzimas termoestables) y proteínas terapéuticas.

Las enzimas termoestables son polipéptidos que funcionan a o por encima de 60 °C. Pueden obtenerse varias enzimas termoestables que son conocidas en la técnica, a partir de organismos termófilos hallados en aguas termales, regiones volcánicas, etc. y pueden usarse como molécula vehículo. La proteína liquinasa B (LicB) de *Clostridium thermocellum* es uno de dichos ejemplos de enzimas termoestables. La presente invención abarca moléculas vehículo recombinantes derivadas de enzimas termoestables de fuentes naturales, es decir, cualquier fuente microbiana (bacteriana y fúngica), o fuentes sintéticas. Ejemplos de dichas enzimas son liquenasa B (Piruzian y col., 2002, Mol Genet Genomics, 266: 778-786), xilanasa y xilosidasa de *Bacillus thermactarantis* que son activas a 80 °C (Calandrelli y col., Res. Microbiol. 2004, 155(4):283-289), formiltransferasa de *Methanopyrus kandleri* (Shima y col., Biochem Soc. Trans., 2004, 32:269-272), Taq polimerasa, alfa-amilasa de *Aspergillus tamarii* (Moreira y col., J. Basic Microbiology, 2004, 44:29-35) o beta-glucosidasa de *Thermus nonproteolyticus* (Wang y col., J. Bacteriology, 2003, 185:4248-55)].

La estructura molecular del gen de liquenasa B de tipo silvestre (LicB) y la proteína es bien conocida para los especialistas en la técnica (véase, número de acceso a GenBank X63355). La LicB de tipo silvestre tiene un péptido señal de 27 aminoácidos de longitud y un péptido maduro de 235 aminoácidos de longitud. El péptido maduro tiene un dominio catalítico y una región bucle de 12 aminoácidos (a.a. 82-94). LicB es un miembro de las glucosil hidrolasas (hidrolasas de β glucano en posición 1-4) y es una proteína termoestable. La temperatura óptima para la actividad enzimática es entre 65-70 °C. De acuerdo con la estructura 3D de la LicB de tipo silvestre, las regiones N y C terminales de la proteína están co-localizadas en cercana proximidad del dominio activo. El bucle externo está posicionado lejos del dominio activo y expuesto sobre la superficie.

Las expresiones "vehículo", "molécula vehículo", "molécula recombinante vehículo" usadas de forma intercambiable

en el presente documento se refieren a una enzima termoestable recombinante usada para la expresión, estabilización, presentación, purificación y/o suministro de polipéptido o polipéptidos heterólogos fusionados de forma traduccional a la enzima termoestable recombinante. La enzima termoestable es recombinante en el sentido en que es un polipéptido maduro modificado de una enzima termoestable de tipo silvestre seleccionada. El polipéptido maduro modificado carece de una o más partes (o cadenas o segmentos) de aminoácidos pero el polipéptido maduro modificado debe retener su actividad enzimática o termoestabilidad. Por ejemplo, el polipéptido maduro puede carecer de una región bucle o una cadena de 5 o más aminoácidos. Además, por ejemplo, la región bucle del polipéptido maduro se altera (i) por introducción de unos pocos aminoácidos codificados por al menos un sitio de restricción único, y/o (ii) por división del gen en esta región bucle para generar dos partes (partes N y C terminales) del polipéptido maduro, dichas dos partes después se re-modifican por ingeniería (se permutan de forma circular) en una única fase de lectura de C-terminal a N-terminal. Como resultado, la parte C-terminal original permanece fusionada cadena arriba de la parte N-terminal original. Durante esta re-modificación por ingeniería, puede incorporarse un sitio o sitios de restricción únicos en los extremos 5' y 3' así como incluirlos de forma interna en el sitio correspondiente al sitio de fusión para que esté recombinado de forma que el polipéptido recombinado esté flanqueado en los extremos N y C terminales por las partes de bucle alteradas de o una cadena de 5 o más aminoácidos.

En el contexto de la presente invención, el sitio de restricción único significa el introducido en el ácido nucleico durante el procedimiento de ingeniería y es el único sitio presente en el ácido nucleico modificado por ingeniería.

Como alternativa, la enzima termoestable es recombinante en el sentido en que es un polipéptido maduro completo o sustancialmente completo de una enzima termoestable de tipo silvestre seleccionada y la secuencia de ácido nucleico recombinante codificada tiene sitios de restricción únicos en el extremo 5' y en el extremo 3', y opcionalmente en la región bucle para la fusión de un polipéptido heterólogo en cada uno de los extremos N-terminal y C-terminal, y en la región bucle. Cadena arriba del sitio de restricción único en el extremo 5', se incorpora un codón ATG. Cadena abajo del sitio de restricción único en el extremo 3', se incorpora un codón de parada. Un especialista en la técnica sabría cómo crear una molécula vehículo de la invención haciendo manipulaciones a nivel de ácido nucleico.

En una realización, la proteína LicB de tipo silvestre está modificada de tal modo que carece del péptido señal y del dominio de unión al celulosoma para crear una molécula vehículo LicB recombinante con sitios de clonación únicos introducidos en la región bucle.

Con referencia a LicB mostrada en la Figura 1C, la LicB de tipo silvestre consta de un péptido líder (27 aminoácidos, indicado como Lp), polipéptido maduro (235 aminoácidos simbólicamente divididos en 3 regiones (A, 1 y C), caja Pro-thr y dominio de unión a celulosoma designado como C-BD. Mientras que Rec LicB contiene solamente la fase de lectura abierta para la proteína madura (235 a. a.) que carece de secuencias para Lp y C-BD. En algunas realizaciones, sin embargo, se retiene C-BD.

En otra realización, la proteína LicB de tipo silvestre está modificada de modo que se deleciona ciertas regiones de la misma juntas y se redistribuyen o intercambian ciertas regiones de la misma para crear una molécula vehículo recombinante. Específicamente, las regiones N y C terminales (designadas en el presente documento como A y C, respectivamente) se permutan de forma circular. Por ejemplo, una molécula vehículo recombinante mencionada en el presente documento como LicKM puede crearse del siguiente modo. Como se describe en la breve descripción de la Figura 1, se usan conjuntos de cebadores para obtener los fragmentos A y C que posteriormente se ligan como C-A, fusionando el fragmento A en la fase de lectura abierta del fragmento C. LicKM mantiene tanto la actividad enzimática como la termoestabilidad similares a la de tipo silvestre.

Las moléculas vehículo recLicB y LicKM son simplemente moléculas preferidas y ejemplares de la enzima. Debería ser fácilmente evidente que pueden prepararse varias moléculas vehículo recLicB o LicKM variantes o equivalentes (y secuencias de nucleótidos que codifican moléculas equivalentes) que tienen la misma o similar o superior termoestabilidad mutando estas moléculas vehículo preferidas, por ejemplo, por delección, adición o sustitución de aminoácidos o por evolución dirigida o redistribución génica de estas moléculas. Un especialista en la técnica sabría cómo realizar dichas alteraciones para llegar a moléculas vehículo basadas en LicB equivalentes o variantes. Una molécula vehículo variante, según se usa el término en el presente documento, tendrá la misma capacidad, como la de recLicB o LicKM, para facilitar al menos una de expresión, estabilización, presentación, purificación o suministro de un polipéptido heterólogo fusionado a la molécula.

Una molécula vehículo variante o equivalente tendrá un grado de similitud o identidad de aminoácidos con la molécula preferida ejemplificada (por ejemplo, LicKM, o RecLicB). Esta similitud o identidad de aminoácidos normalmente será mayor del 60 %, preferentemente será mayor del 75 %, más preferentemente mayor del 80 %, aún más preferentemente mayor del 90 %, y puede ser mayor del 95 %. La similitud o identidad de aminoácidos será la más elevada en regiones críticas de la molécula vehículo que suponen la termoestabilidad de la molécula y están implicadas en la determinación de la configuración tridimensional que en última instancia es responsable de su función vehículo. A este respecto, son aceptables ciertas sustituciones de aminoácidos y puede esperarse si estas sustituciones están en regiones que no son críticas para la actividad o son sustituciones conservativas de aminoácidos que no afectan a la configuración tridimensional de la molécula. Las sustituciones conservativas

mediante las cuales se reemplaza un aminoácido de una clase (clase no polar tal como Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; polar no cargada tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; básica tal como Lys, Arg, His; o ácida tal como Asp, Glu) con otro aminoácido de la misma clase siempre que la sustitución no altere de forma material la termostabilidad o configuración tridimensional. En algunos casos, también pueden hacerse sustituciones no conservativas. El factor crítico es que estas sustituciones no deben limitar significativamente la capacidad de la "molécula vehículo variante" para facilitar al menos una de expresión, estabilización, presentación, purificación o suministro de un polipéptido heterólogo.

La expresión "proteína de fusión vehículo o proteína vehículo" como se usa en el presente documento se refiere en líneas generales a un polipéptido o proteína de fusión quimérica en la que están fusionados uno o más polipéptidos heterólogos a la molécula vehículo.

La arquitectura general de la proteína vehículo puede ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes:

NH₂-molécula vehículo-polipéptido heterólogo-COOH
 NH₂-marca-sitio de escisión-molécula vehículo-polipéptido heterólogo-COOH
 NH₂-molécula vehículo-sitio de escisión-polipéptido heterólogo-COOH
 NH₂-marca-molécula vehículo-sitio de escisión-polipéptido heterólogo-COOH
 NH₂-marca-sitio de escisión-molécula vehículo-polipéptido heterólogo-COOH

La molécula vehículo también puede tener una fusión interna, en cuyo caso el polipéptido heterólogo está flanqueado en cada lado por un segmento de la molécula vehículo recombinante. La proteína vehículo muestra un elevado grado de termotolerancia (al menos a aproximadamente 60 °C) que facilita la separación de la proteína de fusión de todas las demás proteínas, ácidos nucleicos, pirógenos y similares de la célula huésped después de someter el lisado a calor y/o centrifugación. La fusión de polipéptido o polipéptidos heterólogos en el extremo N-terminal o C-terminal o de forma interna de una molécula vehículo puede no provocar la pérdida de actividad enzimática y termostabilidad.

También puede ligarse una marca a la molécula vehículo o proteína vehículo como herramienta para la purificación. La marca servirá como herramienta adicional para la purificación de la molécula vehículo o proteína vehículo. La marca puede servir como herramienta de retroceso para la purificación. La marca se refiere a un péptido usado para facilitar la purificación de una proteína de fusión preparada a través de expresión por recombinación génica. Se prefiere que la unión entre una marca y una sustancia capaz de unirse a la misma sea reversible. La marca puede ser, por ejemplo, glutatión S-transferasa con afinidad por glutatión, una secuencia peptídica de restos de histidina donde la histidina tiene afinidad por un metal, y similares conocidos en la técnica. En una realización preferida de la invención, dicha marca es His His His His His His (SEC ID N°:2) (es decir, (His)₆). En la presente invención, pueden posicionarse una o más secuencias enlazadoras en la proteína vehículo según sea necesario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido o proteína heteróloga" se refiere a un polipéptido o proteína de interés (para uso terapéutico, diagnóstico o preventivo) que está codificada por el ácido nucleico introducido en una célula huésped. La expresión polipéptido o proteína heteróloga no incluye una enzima termostable o dominios de una enzima termostable o su péptido señal. El polipéptido heterólogo para propósitos de la presente invención indica un polipéptido de hasta 100 kDa y mayor y generalmente se refiere a un polipéptido que no es endógeno al huésped seleccionado, aunque esta definición también incluirá péptidos endógenos en casos en los que se desea la sobreexpresión de los mismos. Además, el polipéptido heterólogo también mostrará alguna forma de actividad útil, normalmente actividad antigénica para su uso en vacunas recombinantes y/o ensayos inmunológicos u otra actividad biológica (por ejemplo, como hormona peptídica, marcador biológico, etc.).

Los polipéptidos heterólogos incluyen factores de crecimiento, citoquinas, ligandos, receptores e inhibidores, así como determinantes antigénicos y anticuerpos. Las proteínas heterólogas también pueden incluir enzimas tales como hidrolasas incluyendo carbohidrasas, y lipasas. Polipéptidos representativos dentro del alcance de la invención incluyen, sin limitación, GFP, IFN α , antígenos (o epítomos) tales como de toxina tetánica, ántrax, virus del sarampión, Mycobacterium tuberculosis, peste, y anticuerpos monoclonales específicos para RSV, insulina, y similares.

Además también pueden usarse otros péptidos o proteínas (o fragmentos de los mismos) tales como epítomos de citoquinas, por ejemplo, interleuquina-2 (IL-2), o el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o péptidos que contienen epítomos tanto de linfocitos T como de linfocitos B para reclutar diversos sistemas efectores del sistema inmune, según sea necesario. Por ejemplo, basándose en las secuencias de nucleótidos disponibles del patógeno diana, se pueden clonar fases de lectura abierta generadas por ordenador, expresar los polipéptidos diana en un sistema apropiado y seleccionarlos usando material de individuos infectados. Los polipéptidos diana seleccionados basándose en su inmunorreactogenicidad pueden usarse para desarrollar vacunas candidatas, reactivos terapéuticos o de diagnóstico. La selección podría proporcionar un procedimiento altamente potente y eficaz en términos de tiempo y sería particularmente importante si se tiene que mantener el ritmo de los patógenos emergentes o los brotes de enfermedad tales como SARS. Además, la molécula vehículo puede usarse para determinar los antígenos de vacuna apropiados para desarrollar una vacuna eficaz contra patógenos tales como SARS, tuberculosis así como vacunas de subunidad (por ejemplo, contra la hepatitis B usando antígeno de superficie).

Pueden introducirse uno o más sitios de escisión entre la molécula vehículo y el polipéptido heterólogo dependiendo de la localización del polipéptido heterólogo en la proteína vehículo. Esto puede facilitar adicionalmente la purificación de los polipéptidos diana. También puede proporcionar ventajas sobre las actuales metodologías de síntesis de proteínas, que provocan muchos más residuos de reactivo y disolventes tóxicos que deben desecharse.

5 Por ejemplo, puede introducirse cualquiera de los varios sitios de escisión conocidos de la técnica previa específicos para proteasas u otras de dichas enzimas o agentes químicos útiles en la hidrólisis eficaz de enlaces peptídicos. Las proteasas que son activas tanto endopeptidasas así como exopeptidasas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse un sitio de escisión específico de proteasa en una proteína vehículo LicKM recombinante de modo que la molécula vehículo LicKM tenga en su extremo N-terminal una marca poli His y en su extremo C-terminal el sitio de escisión seguido por un polipéptido diana tal como un determinante antigénico y/o un polipéptido terapéutico de interés (por ejemplo, interferón).

10 En algunas realizaciones, para mejorar los parámetros cualitativos y cuantitativos de los polipéptidos diana, pueden añadirse secuencias de señal de secreción. El uso de secuencias líder o secuencias de señal de secreción es solamente opcional, no necesario, para poner en práctica la presente invención. Por ejemplo, se pueden construir vectores recombinantes que contienen la proteína vehículo con una secuencia líder tal como para dirigir la secreción de proteínas heterólogas en el medio usado para cultivar diversas células huésped.

Dicho sistema posibilitaría la síntesis homogénea de la proteína recombinante y el sistema permitiría un fácil aumento a escala y posterior procesamiento cadena abajo, por ejemplo, purificación. Dichas modificaciones se han hecho a varias proteínas conocidas en la técnica.

20 Los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse a la región flanqueante de la molécula vehículo como se ha resumido anteriormente, ya sea en una localización única o localizaciones no contiguas. Hablando en líneas generales, en el contexto de las proteínas vehículo como vacunas, polipéptidos heterólogos o una secuencia de aminoácidos que contiene uno o más epítopos (es decir, segmentos que contienen epítopos que tienen dos o más epítopos idénticos o no idénticos), que pueden estimular una respuesta inmune que protege o evita contra una enfermedad infecciosa o reacciones alérgicas son polipéptidos candidatos. El uso de un segmento que contiene epítipo en el cual se presentan dos o más epítopos distintos se prefiere cuando se intenta crear anticuerpos bifuncionales para usos experimentales, de diagnóstico o terapéuticos. Los polipéptidos heterólogos pueden contener epítopos que pueden ser epítopos de linfocitos B, epítopos de linfocitos T o una mezcla de epítopos de linfocitos B y T. En algunos contextos, los epítopos preferidos son epítopos de linfocitos B que se sabe que son una diana para anticuerpos neutralizantes.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a una proteína vehículo que tiene la molécula vehículo recombinante fusionada a dos o más segmentos polipeptídicos heterólogos que contienen epítopos no contiguos. Las localizaciones no contiguas en que es apropiada la fusión son localizaciones internas dentro del resto de proteína vehículo incluyendo la región bucle, o en el extremo N o C-terminal de la molécula vehículo recombinante.

35 Se ha descubierto en la presente invención que pueden hacerse inserciones y sustituciones dentro de estas regiones bucle sin alterar la integridad de la molécula vehículo o eliminar las características que hacen de las enzimas termoestables recombinantes un vehículo útil para el suministro y expresión de diversos polipéptidos o la presentación de polipéptidos heterólogos que contienen epítopos. Inserciones y sustituciones dentro de estas regiones bucle tienden a no alterar las relaciones entre las características estructurales prominentes de la molécula vehículo. Un especialista en la técnica sabría cómo crear una proteína vehículo de la invención haciendo manipulaciones a nivel de ácido nucleico.

40 En algunas realizaciones, la proteína vehículo tendrá sitios de escisión de modo que los polipéptidos heterólogos fusionados al extremo C-terminal, N-terminal y/o de forma interna de una molécula vehículo recombinante de la invención puede escindirse por proteasas específicas in vivo o in vitro. Esto permite administrar el péptido a una célula como parte de una proteína de fusión más grande que es tanto más fácil de purificar como más fácil de manipular en comparación con el polipéptido heterólogo libre. Después de la captación celular, el polipéptido heterólogo unido a la molécula vehículo puede escindirse de la molécula.

45 Un especialista en la técnica sabría cómo crear una proteína vehículo de la invención haciendo manipulaciones a nivel de ácido nucleico. La construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias codificantes y de control deseadas emplea técnicas convencionales de ligamiento y restricción que son bien comprendidas en la técnica. Los plásmidos aislados, secuencias de ADN, u oligonucleótidos sintetizados se escinden, se adaptan y religan en la forma deseada. Pueden usarse vectores virales tales como vectores virales de plantas, insectos y mamíferos o plásmidos bacterianos como vectores.

50 Como ejemplos representativos de vectores de expresión pueden ser partículas virales, plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN viral (por ejemplo, vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia y derivados de SV40), plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico para huéspedes específicos de interés (tales como bacterias, levaduras y otros hongos, plantas, etc.) Por tanto, por ejemplo, el ADN puede incluirse en uno cualquiera de diversos vectores de expresión para

expresar la proteína vehículo recombinante. Los especialistas en la técnica conocen grandes cantidades de vectores adecuados, y están disponibles en el mercado. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo; Bacterianos: pQE70 (Qiagen), pBlue-script SK, pBluescript KS (Stratagene); pTRC99a" pRIT2T (Farmacia); Eucariotas: pWLNEO, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pSVLSV40 (Farmacia). Puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el huésped.

El ADN recombinante capaz de codificar la proteína vehículo puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios apropiados para endonucleasas de restricción mediante procedimientos conocidos en la técnica.

La secuencia de ADN en el vector de expresión se liga de forma funcional a una secuencia o secuencias apropiadas de control de la expresión o un promotor para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores usados en la presente invención pueden ser ubicuos o constitutivos y/o promotores específicos de tejido de organismos procariontes y eucariotas. Ejemplos de promotores constitutivos son el promotor de CaMV 35S, el promotor de la nopalina sintasa, el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, promotor de Act1, SAM sintasa, y el promotor de Ubi y el promotor de la proteína de unión a clorofila a/b. Ejemplos de promotores específicos de tejido son el promotor del gen del inhibidor II de la proteasa de patata (pin2), el promotor del gen de napina, el promotor del gen de cruciferina, el promotor del gen de beta-conglicinina, el promotor del gen de faseolina, el promotor del gen de zeína, el promotor del gen de oleosina, el promotor del gen de la proteína vehículo de acilo esteroil-ACP desaturasa, un promotor del gen de la ácido graso desaturasa, glicinina, Bec4 y promotores de varios genes del nódulo. Se conocen varios de dichos promotores en la técnica. También se contemplan promotores inducibles que responden específicamente a ciertos agentes químicos (cobre etc.) o choque térmico (HSP). Además, los promotores también incluyen secuencias artificiales diseñadas para funcionar como promotores. La selección del vector y promotor apropiados pertenece al nivel de los especialistas en la técnica. El vector de expresión también contiene otras secuencias apropiadas de control u otras regiones para facilitar la transcripción y traducción y selección.

El vector de expresión puede introducirse en un huésped adecuado. La célula huésped puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, célula vegetal o una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procarionte, tal como una célula bacteriana. También pueden usarse cultivos de células vegetales y animales para producir proteínas vehículo de la invención. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de los especialistas en la técnica de los contenidos del presente documento. Las células huésped preferidas son células vegetales y los organismos son plantas. La introducción de la construcción en la célula huésped puede realizarse por transformación, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se consigue usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. Puede usarse tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, que es conocido en la técnica para procariontes y otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. Las transformaciones en levaduras se realizan de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Para células de mamífero sin paredes celulares, puede usarse electroporación o procedimientos de captación de ADN. Las células de insecto conocidas y usadas de forma rutinaria para propósitos de expresión de proteínas también se usan como célula huésped en la presente invención. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para ciertas células vegetales. Por consiguiente, en los procedimientos de la invención, la planta de interés se transforma con un vector que contiene la proteína vehículo de interés para producir una planta transgénica. Pueden usarse procedimientos de transformación basados en *Agrobacterium* para producir plantas transgénicas. Están disponibles en la técnica otros varios procedimientos para la transformación estable de plantas (véase, Piruzian y col., 2002, Mol Genet Genomics 266:778-786). En la presente invención, las construcciones RecLicB y LicKM que contienen varios antígenos diana, incluyendo el péptido de RSV y el antígeno superficial de hepatitis B pueden expresarse en plantas.

La proteína vehículo de la presente invención también puede expresarse a partir de un vector viral adecuado después de infectar una planta huésped con el vector viral seleccionado. Los vectores virales recombinantes pueden construirse manipulando el componente genómico de los virus de tipo silvestre. Los virus preferidos son virus vegetales que contienen ARN. Aunque muchos virus vegetales tienen genomas de ARN, es bien sabido que la organización de la información genética difiere entre grupos. Por tanto, un virus puede ser un virus mono-, bi-, tri-partito. "Genoma" se refiere al material genético total del virus. "Genoma de ARN" indica que presente en los viriones (partículas víricas), el genoma está en forma de ARN.

Algunos de los virus que cumplen este requisito, y son, por lo tanto, adecuados, incluyen el virus del mosaico de la alfalfa (A1MV), ilarvirus, cucumovirus tales como el virus del mosaico verde moteado del pepino (CGMMV), closterovirus o tobamavirus (grupo del virus del mosaico del tabaco) tales como el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del virus del jaspeado del tabaco (TEV), virus del mosaico del caupí (CMV), y virus del grupo del virus del mosaico del bromo tales como el virus del mosaico del bromo (BMV), virus moteado del haba y el virus del moteado clorótico del caupí. Virus adecuados adicionales incluyen el virus necrótico del arroz (RNV), y geminivirus tales como el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV), el virus latente de la mandioca (CLV) y el virus del estriado del maíz (MSV). Cada uno de estos grupos de virus adecuados está bien caracterizado y es bien conocido para los especialistas en la técnica del campo. Los especialistas en la técnica han usado varios vectores virales

recombinantes para expresar de forma transitoria diversos polipéptidos en plantas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.316.931 y 6.042.832; y la publicación internacional PCT, WO 00/46350, WO 96/12028 y WO 00/25574. Por tanto, los procedimientos ya conocidos en la técnica pueden usarse como directriz para desarrollar vectores virales recombinantes de la presente invención para suministrar factores de transacción.

- 5 El vector viral recombinante usado en la presente invención puede ser vectores virales heterólogos. Los vectores virales heterólogos mencionados en el presente documento son aquellos que tienen un componente genómico recombinante de una clase dada de virus (por ejemplo, TMV) con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de movimiento de la clase dada de virus pero la secuencia de ácido nucleico de la proteína de cubierta (de longitud completa o truncada pero funcional) de una clase diferente de virus (por ejemplo AIMV) en lugar de la
10 secuencia de ácido nucleico de la proteína de cubierta nativa de la clase dada de virus. Asimismo, se reemplaza la secuencia de ácido nucleico de la proteína de movimiento nativa en lugar de la secuencia de la proteína de cubierta por una proteína heteróloga de movimiento (es decir no nativa) de otra clase de virus. Por ejemplo, un componente genómico de TMV que tiene una proteína de cubierta de AIMV es uno de dichos vectores heterólogos. Asimismo, un componente genómico de AIMV que tiene una proteína de cubierta de TMV es otro de dichos vectores heterólogos.
15 Los vectores se diseñan de tal modo que estos vectores, tras infección, son capaces de replicarse en la célula huésped y expresar de forma transitoria la proteína vehículo en la célula huésped.

En un aspecto de la invención, se usan tanto vectores virales como plantas transgénicas para expresar las proteínas vehículo de la presente invención en células de una planta huésped aprovechando un sistema de transactivación proporcionado. El sistema de transactivación tiene dos componentes: (i) una planta transgénica y (ii) un vector viral recombinante. Las células transformadas genéticamente de la planta huésped que tiene integrada en su genoma nuclear una secuencia de ácido nucleico que codifica proteína vehículo inactiva o silenciada, son capaces de codificar la proteína vehículo solamente tras la activación de la secuencia silenciada. Para activar la secuencia silenciada, se usa un vector viral de ARN recombinante que es capaz de infectar las células de la planta huésped y codificar en la misma un factor para activar la expresión de la secuencia de ácido nucleico de proteína vehículo
20 inactiva o silenciada. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína vehículo puede silenciarse colocando una secuencia de bloqueo entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína vehículo. La secuencia de bloqueo (por ejemplo, un elemento marcador de selección o cualquier otra secuencia de ácido nucleico (relleno) debe ser suficiente para bloquear la capacidad del promotor para dirigir la expresión del gen. La secuencia de bloqueo debe estar flanqueada en cada lado por un sitio diana para recombinasa (por ejemplo, sitio "FRT") con una orientación 5' a 3' definida. La FRT se refiere a una secuencia de ácido nucleico en que el producto del gen FLP, es decir, la FLP recombinasa, puede catalizar la recombinación específica de sitio. Además de los elementos genómicos necesarios para la infección, replicación, movimiento y propagación de los vectores virales, los vectores contienen secuencias que codifican una recombinase (por ejemplo, FLP) u otro factor (por ejemplo, GAL4-VP16) para activar la secuencia de ácido nucleico que codifica proteína vehículo silenciada.

35 De acuerdo con la presente invención, las plantas huésped incluidas dentro del alcance de la presente invención son todas las especies de plantas superiores e inferiores del reino vegetal. Se incluyen plantas maduras, plántulas, y semillas en el alcance de la invención. Una planta madura incluye una planta en cualquier fase de desarrollo más allá de plántula. Una plántula es una planta inmadura muy joven en las fases tempranas de desarrollo. Específicamente, las plantas que pueden usarse como huéspedes para producir secuencias y polipéptidos foráneos
40 incluyen y no se limitan a Angiospermas, Briofitos tales como Hepaticae (hepáticas) y Musci (musgos); Pteridofitos tales como helechos, colas de caballo, y lycopodios; Gimnospermas tales como coníferas, cicadáceas, Ginkgo, y Gnetales; y algas incluyendo Clorophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae, Xanthophyceae, y Euglenophyceae.

Las plantas huésped usadas para la producción de proteínas vehículo pueden cultivarse in vivo y/o in vitro dependiendo del tipo de planta seleccionada y la localización geográfica. Es importante que la planta seleccionada sea susceptible a cultivo en las condiciones de campo apropiadas y/o las condiciones in vitro incluyendo cultivo celular.

Entre las angiospermas, el uso de miembros de cultivo y/o relacionados con cultivo de las familias se contempla particularmente. Los miembros vegetales en los presentes procedimientos también incluyen híbridos interespecíficos y/o intergenéricos, plantas mutagenizadas y/o modificadas por ingeniería genética. Estas familias incluyen y no se limitan a Leguminosae (Fabaceae) incluyendo guisante, alfalfa, y soja; Graminae (Poaceae) incluyendo arroz, maíz, trigo; Solanaceae particularmente del género *Lycopersicon*, particularmente la especie *esculentum* (tomate), el género *Solanum*, particularmente las especies *tuberosum* (patata) y *melongena* (berenjena), el género *Capsicum*, particularmente la especie *annum* (pimiento), tabaco, y similares; Umbelliferae, particularmente de los géneros
55 *Daucus*, particularmente la especie *carota* (zanahoria) y *Apium*, particularmente la especie *graveolens dulce* (apio) y similares; *Rutaceae*, particularmente de los géneros *Citrus* (naranjas) y similares; Compositae, particularmente el género *Lactuca*, y la especie *sativa* (lechuga), y similares y la familia Cruciferae, particularmente de los géneros *Brassica* y *Sinapis*. Ejemplos de miembros de cultivo "vegetativo" de la familia Brassicaceae incluyen, aunque sin limitación, tetraploides digenómicos tales como *Brassica juncea* (L.) Czern. (mostaza), *B. carinata* Braun (mostaza etíope), y diploides monogenómicos tales como *B. oleracea* (L.) (cultivos de coles), *B. nigra* (L.) Koch (mostaza negra), *B. campestris* (L.) (nabo) y *Raphanus sativus* (L.) (rábano). Ejemplos de miembros de cultivo "oleaginoso" de la familia Brassicaceae incluyen, aunque sin limitación, *B. napus* (L.) (colza), *B. campestris* (L.), *B. juncea* (L.) Czern.

y *B. tournfortii* y *Sinapis alba* (L.) (mostaza blanca). También se contemplan plantas de lino.

Plantas huésped particularmente preferidas son aquellas que pueden infectarse por AIMV. Por ejemplo, se sabe en la técnica que el virus del mosaico de la alfalfa tiene un rango de huésped completo. Otras especies que se sabe que son susceptibles al virus son:

5 *Abelmoschus esculentus*, *Ageratum conyzoides*, *Amaranthus caudatus*,
Amaranthus retroflexus, *Antirrhinum majus*, *Apium graveolens*, *Apium graveolens* var. *rapaceum*, *Arachis hypogaea*,
Astragalus glycyphyllos, *Beta vulgaris*, *Brassica campestris* ssp. *rapa*, *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum*,
Capsicum frutescens, *Caryopteris incana*, *Catharanthus roseus*, *Celosia argentea*, *Cheiranthus cheiri*, *Chenopodium*
10 *album*, *Chenopodium amaranticol*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Cicer arietinum*, *Cichium endiva*,
Ciandrum sativum, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Cyamopsis*
tetragonoloba, *Daucus carota* (var. *sativa*), *Dianthus barbatus*, *Dianthus caryophyllus*, *Emilia sagittata*, *Fagopyrum*
esculentum, *Glycine max*, *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus*, *Lablab purpureus*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus*
odatus, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Lupinus albus*, *Lycopersicon esculentum*, *Macroptilium lathyroides*,
15 *Malva parviflora*, *Matthiola incana*, *Medicago hispida*, *Medicago sativa*, *Melilotus albus*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana*
clevelandii, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris*,
Nicotiana tabacum, *Ocimum basilicum*, *Petunia X hybrida*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Philadelphus*,
Physalis flidana, *Physalis peruviana*, *Phytolacca americana*, *Pisum sativum*, *Solanum demissum*, *Solanum*
melongena, *Solanum nigrum*, *Solanum nodiflum*, *Solanum rostratum*, *Solanum tuberosum*, *Sonchus oleraceus*,
Spinacia oleracea, *Stellaria media*, *Tetragonia tetragonioides*, *Trifolium dubium*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium*
20 *incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium subterraneum*, *Tropaeolum majus*, *Viburnum opulus*, *Vicia*
faba, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*, y *Zinnia elegans*.

En un aspecto, la presente invención también incluye procedimientos para estimular una respuesta inmune en un animal. El uso de la proteína vehículo de la invención para estimular una respuesta inmune se describe en más detalle en la siguiente sección de Ejemplos. Específicamente, los experimentos demuestran, por ejemplo, que los polipéptidos heterólogos inmunogénicos que contienen epítomos de linfocitos B y linfocitos T en la proteína de fusión

25 vehículo estimulaban respuestas inmunes específicas de patógeno. Sorprendentemente, la inmunogenicidad específica de diana de determinantes antigénicos fusionados a la molécula vehículo de la presente invención es significativamente superior a la de los determinantes antigénicos administrados en solitario sin la molécula vehículo. Además, los experimentos demuestran que es posible generar una respuesta inmune humoral contra segmentos polipeptídicos que contienen un epítomo insertado de forma interna. Aunque los datos in vivo presentados en el

30 presente documento se generaron en experimentos empleando ensayos murinos para la generación de anticuerpos contra las proteínas vehículo, son aplicables los principios fundamentales a seres humanos así como otros animales tales como conejos, cerdos, cabras, monos y chimpancés. Dada la divulgación de la presente solicitud y el conocimiento general de los especialistas en la técnica, es materia de experimentación rutinaria la selección de polipéptidos heterólogos de interés y la incorporación de dichos polipéptidos de interés en una molécula vehículo

35 para su uso como inmunógeno. Un especialista en la técnica puede identificar polipéptidos heterólogos con epítomos de linfocitos B que tienen la capacidad de dirigir una fuerte respuesta inmune humoral tras la administración a un animal. El epítomo de linfocito B que se selecciona dependerá del uso pretendido de la proteína vehículo. Por ejemplo, si la proteína vehículo tiene que usar como vacuna, los polipéptidos heterólogos pueden obtenerse de una proteína que se expresa por un virus, bacteria u otro organismo infeccioso asociado con la provocación de una

40 enfermedad. El polipéptido heterólogo, que se selecciona, debe ser uno que contiene epítomos que provocan fuertes respuestas inmunes. En general, éste incluirá proteínas halladas sobre la superficie del organismo infeccioso que están implicadas en la unión y a las que los anticuerpos tienen un elevado grado de acceso.

La selección de polipéptidos heterólogos inmunogénicos no está limitada a proteínas asociadas con organismos infecciosos. Por ejemplo, puede usarse la proteína vehículo que contiene un polipéptido insertado de forma interna

45 (o en el extremo N o C-terminal) de un antígeno específico de próstata para inducir una fuerte respuesta inmune. Un especialista en la técnica reconocerá que cualquier polipéptido heterólogo que contenga uno o más epítomos de linfocito B o linfocito T, que sea capaz de dirigir una respuesta inmune humoral puede incluirse como parte de la proteína vehículo de la presente invención. Muchos de dichos polipéptidos heterólogos son conocidos y otros pueden determinarse a través de experimentación rutinaria.

50 En algunos casos, se desea estimular linfocitos T citotóxicos como parte de una respuesta inmune celular. En dichos casos, se fusionan polipéptidos heterólogos con epítomos de linfocitos T con la molécula vehículo, preferentemente insertados de forma interna dentro del vehículo. Los linfocitos T citotóxicos desempeñan una tarea importante en la vigilancia y control de infecciones víricas, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias y cáncer, por ejemplo, protocolos de activación de linfocitos T permiten la activación de respuestas más selectivas de linfocitos T con mayor

55 eficacia terapéutica.

Generalmente, la fusión de péptidos al extremo C-terminal de la molécula vehículo con un sitio de escisión entremedias, puede generar una construcción deseable, que se puede escindir, in vivo, por el agente de escisión específico de proteína vehículo recombinante. El agente de escisión específico de proteína vehículo (por ejemplo, proteasas) escinde la fusión de la proteína vehículo tras un resto C-terminal liberando de este modo el péptido C-terminal.

60

Por tanto, la vacuna basada en proteína vehículo puede usarse para dirigir una respuesta inmune celular y/o humoral dependiendo del tipo de polipéptidos heterólogos fusionados a la proteína vehículo. La cantidad terapéutica de la proteína vehículo dada a una especie animal se determinará como la cantidad considerada eficaz para provocar la respuesta inmune deseada. La proteína vehículo se administra en un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable o compatible. Por consiguiente, la presente invención también abarca composiciones farmacéuticas para la administración de proteínas vehículo. Ejemplos de enfermedades específicas que pueden tratarse de este modo incluyen, por ejemplo, infección con VIH, cáncer, enfermedades gastrointestinales, infecciones respiratorias, etc. Las composiciones farmacéuticas se preparan por procedimientos conocidos para los especialistas en la técnica. En general, la proteína vehículo se mezcla con un vehículo y otros diluyentes necesarios que son conocidos en la técnica para ayudar a producir un producto que es estable y administrable. La administración de la composición farmacéutica puede realizarse por varios medios conocidos para los especialistas en la técnica. Estos incluyen, i.p., oral, intradérmico, subcutáneo, intranasal, intravenoso o intramuscular. Normalmente, a los pacientes a tratar se les dosifica por vía subcutánea las proteínas vehículo una vez a la semana durante varias semanas. Sin embargo, la dosificación también puede hacerse de forma oral o intranasal durante una longitud de tiempo similar. El resultado es una reducción de las respuestas alérgicas y/o autoinmunes.

Además de los procedimientos de vacunación convencionales, la presente invención puede usarse para la vacunación con ADN. En este procedimiento, se introduce ADN que codifica la proteína vehículo apropiada en las células de un organismo. Dentro de estas células, la proteína vehículo que contiene epítipo se expresa directamente. La expresión directa de las proteínas vehículo de la presente invención por células endógenas de un animal vacunado permite la estimulación continua de respuestas inmunes humorales y celulares durante un periodo prolongado de tiempo. La expresión directa puede realizarse introduciendo construcciones de ADN que codifican la proteína vehículo deseada en las células de un animal. Las construcciones normalmente contienen elementos promotores y otros elementos de control de la transcripción que dirigen la expresión de la proteína vehículo. La introducción de la construcción de ADN puede ser por cualquier medio convencional incluyendo inyección directa. El sitio preferido de administración es el tejido muscular. Esta expresión directa contrasta con los protocolos convencionales de inmunización mediante los cuales se inyecta la vacuna en un único sitio una o más veces. Después de la inyección, la vacuna se disemina a los órganos linfoides donde sucede una única respuesta inmune.

Ejemplos

Los ejemplos presentados a continuación se proporciona como guía adicional para los especialistas en la técnica, y no deben entenderse de ningún modo como limitantes de la invención.

Ejemplo 1: Construcción de moléculas vehículo y proteínas vehículo

Este ejemplo aborda la construcción del vector de expresión de la proteína vehículo para su expresión en células procariotas y eucariotas.

En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de modificación por ingeniería de las moléculas vehículo recombinantes LicKM y recLicB. La letra "I" indica la estructura de bucle, A indica la región (dominio) cadena arriba de la estructura de bucle y C indica la región (dominio) cadena debajo de la estructura de bucle. Para crear LicKM se divide el gen que codifica una Lic B madura en la región bucle y se ensambla como se muestra. Se crean sitios de clonación únicos durante la modificación por ingeniería. La secuencia del gen modificado por ingeniería (LicKM) se muestra en la parte B de la figura 1.

La LicKM se creó en clonación por PCR de 2 etapas. Se usaron cebadores 5' y 3' para amplificar el gen *lic B* en 2 fragmentos denominados A (159 nucleótidos del gen *lic B*, 364 a 522) y C (486 nucleótidos del gen *lic B*, 523 a 1009). En el clon final, se clonó el fragmento A cadena abajo del fragmento C conservando la composición original de aminoácidos.

Lo siguiente son los cebadores específicos usados

Fragmento C:

cebador 5': 5'gga tcc ATG GGC GGT TCA TAT CCG TAT-3' (SEC ID N° 10)
 cebador 3': 5'g cag aga TCT ATA TTC CCT GTC AAG GGT-3' (SEC ID N° 11)

Fragmento A:

cebador 5': 5'aga tcc ATG GTG GTA AAT ACG CCT TTT-3' (SEC ID N° 12)
 cebador 3': 5'g cac aga TCT ACC GTT AGG ATA GTA TTT TAC-3' (SEC ID N° 13).

En la Figura 1C se muestra un esquema de construcción de rec LicB a partir de LicB de tipo silvestre.

Ejemplo 2: Clonación y expresión de GFP Usando recLic B

La recLic B se dividió simbólicamente en 3 regiones como se muestra en la Figura 2; 1 es la estructura de bucle. La región (dominio) cadena arriba de la estructura de bucle se indica como A y cadena debajo de la estructura de bucle

se indica como C. Para usar la reLic B como molécula vehículo se introdujeron sitios de clonación únicos (*BamHI* y *BglII*) en la región bucle del gen. El gen que codifica GFP (proteína fluorescente verde) se clonó en la región bucle de reLic B para obtener reLic B-GFP (Fig. 2). La proteína recombinante se expresó usando tanto *Escherichia coli* como el sistema de expresión en levaduras (Fig. 3). Los polipéptidos diana pueden insertarse no solamente en la estructura de bucle como se muestra en este ejemplo sino que también pueden fusionarse al extremo N o C terminal de la proteína vehículo.

Ejemplo 3: Fermentación y recuperación de la proteína vehículo.

Se cultivaron células *E. coli* dh5alfa transformadas con construcciones reLic B-GFP o se fermentaron por procedimiento de cultivo durante una noche en medio LB. La fermentación se continuó durante 12 h y se recogió a una densidad celular de 10^4 . Se dividieron dos litros de cultivo celular o caldo de fermentación en recipientes/frascos de 1 litro y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 min. en una centrífuga. El sobrenadante se desechó y se usó el sedimento para recuperar la proteína vehículo.

Ejemplo 4: Clonación y expresión de diversos polipéptidos diana usando la LicKM modificada por ingeniería

Este ejemplo aborda la clonación y expresión de los siguientes tres polipéptidos diana usando la LicKM modificada por ingeniería:

- a. Péptido de proteína G de virus sincitial respiratorio (24 a.a.)
- b. GFP (27 kD)
- c. IFN α (19 kD)

Para demostrar la capacidad de LicKM modificada por ingeniería como molécula vehículo, se crearon 3 construcciones donde se amplificaron por PCR las secuencias diana de los polipéptidos (a) fragmento de ADN que codifica un péptido de 24 aminoácidos de la proteína G del virus sincitial respiratorio, (b) fase de lectura abierta de GFP o (c) fase de lectura abierta de interferón α humano y se clonaron en la fase de lectura abierta de LicKM modificada por ingeniería como se muestra en la figura 4. Estos tres polipéptidos diana modificados por ingeniería se expresaron en *E. coli* como se muestra en la figura 5 y levaduras (datos no mostrados). En la Figura 5A se muestra un zimograma de actividad liquenasa en extractos bacterianos detectada en presencia de liquenano al 0,1 % como sustrato. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %. El gel se cargó con proteínas extraídas de *E. coli* cepa XL-1 blue. C es un control negativo. LicKM es la molécula vehículo modificada por ingeniería. LicKM-RSV, LicKM-GFP, y LicKM-IFN α son proteínas modificadas por ingeniería que contienen el polipéptido diana respectivo. La Figura 5B muestra los resultados del análisis de transferencia de Western. Las proteínas se separaron en PAGE al 12 %, se electrotransfirieron a membrana de nylon y se hicieron reaccionar con anticuerpos monoclonales específicos para el péptido de la proteína G de RSV. Los anticuerpos reaccionaron con LicKM-RSV, el control positivo de RSV (RSV (C+)) y el péptido idéntico que contenía la proteína de cubierta del virus vegetal (RSV (plantas)). Los extractos de LicKM que no contenían péptido diana no tuvieron especificidad por anticuerpos RSV.

Ejemplo 5: Inmunización de ratones con LicKM-RSV que contenía un péptido de 24 aminoácidos de la proteína G de RSV.

Se inmunizaron ratones balB/c hembra de ocho semanas de edad con 200 μ g por dosis de LicKM recombinante-RSV modificada por ingeniería para expresar los 24 aminoácidos (171-191 de la proteína G) de la proteína G de RSV (Johnson y col., 2004, J Virol. 2004 Jun; 78(11):6024-32). Se administraron tres inmunizaciones de 0,1 ml por vía intraperitoneal a intervalos de 2 semanas (primera dosis con adyuvante completo de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol, segunda dosis con adyuvante incompleto de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol y tercera dosis sin ningún adyuvante). Se usó una cantidad igual de LicKM como control. Se recogieron muestras de sueros preinmunes 1 día antes de la primera dosis de antígeno. Doce (12) días después de cada inmunización, se obtuvieron muestras séricas de ratones individuales y se evaluaron los títulos de anticuerpo específico de RSV. El análisis de anticuerpo específico de antígeno del suero se realizó usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida. Las placas ELISA (Nunc Polysorp, Dinamarca) se recubrieron con 100 μ l por pocillo (1,0 μ g por pocillo) de AIMV recombinante que contenía el péptido idéntico de proteína G de RSV (10 μ g/ml en solución salina tamponada con fosfato) durante una noche a temperatura ambiente (TA; aproximadamente 25 °C). Las placas recubiertas se lavaron 3x con PBS-Tween (0,05 %) y después se bloquearon con un 0,5 % de I-block (Tropix) en PBS-Tween a TA durante al menos 1 hora. Se añadió una serie de diluciones de suero a las placas (30 μ l/pocillo) durante 2 a 4 horas a TA. Las placas después se lavaron 3x con PBS-Tween y se añadieron (100 μ l por pocillo) anticuerpos secundarios conjugados con peroxidada (de cabra anti-IgG de ratón, molécula completa o cadena gamma específica), a una dilución final de 1:10.000 en PBS-Tween, durante 1 hora a TA. Las placas después se lavaron 5x con PBS-Tween y se añadió (100 μ l/pocillo) sustrato OPD (Sigma Fast™) en tampón fosfato-citrato que contenía urea, durante 30 min. a TA en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M (50 μ l por pocillo) y se midió el cambio de color resultante del anticuerpo específico unido a 490 nM en un lector de placa ELISA (Spectramax Plus³⁸⁴). Los resultados, expresados en unidades de D.O., se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 6: Modificación por ingeniería e inmunización experimental de ratones con LicKM-F200 que contiene una parte de 200 aminoácidos de la proteína F de RSV.

La modificación por ingeniería de LicKM-F200 se realizó del siguiente modo: Como ADN molde, se usó ADN plasmídico que contenía ADNc para los genes F, G, y M de RSV obtenido del National Institute of Health, EEUU (Johnson y col., 2004, J Virol. 2004 Jun;78(11):6024-32).

Para la clonación, se amplificó una parte del gen F que codifica los aminoácidos 324 a 524 usando 5'- GCAC AGATCT GGGTCCAACATCTGTTTAAAC -3' (SEC ID N° 14) y 5'- GCAC AAGCTT ATTTGTGGTGGATTACCA -3' (SEC ID N° 15) como cebadores 5' y 3'. El fragmento amplificado por PCR se digirió y se clonó en el vector final usando sitios de restricción únicos introducidos durante la reacción de PCR (sitio *Bgl*II en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3', respectivamente). El ADN diana se clonó en *E. coli*, vectores de expresión de agrobacterias y virus vegetales. Los resultados descritos en este ejemplo se obtuvieron usando LicKM-F200 donde está clonado el gen diana y expresado en el vector de virus vegetal D4.

Para la expresión, las plantas se inocularon con transcritos sintetizados *in vitro* de LicKM-F200. Las inoculaciones en las plantas se realizaron usando los procedimientos conocidos de la técnica previa. Véase la publicación internacional PCT WO 00/46350 para directrices sobre los transcritos infecciosos de ARN y procedimientos para infección vírica. Dos semanas después de la inoculación, se recogieron muestras para el análisis de la expresión de proteína diana así como para la recuperación. La proteína recombinante mantenía la actividad enzimática (Fig. 7A) y se reconoció por anticuerpos específicos para LicKM (Fig. 7B).

Para estimular la respuesta inmune, se inmunizaron ratones balB/c hembra de ocho semanas de edad con 200 µg por dosis de LicKM-F200 recombinante modificada por ingeniería para expresar los 200 aminoácidos (aminoácidos 324 a 524 de la proteína F) de la proteína F de RSV. Se administraron tres dosis de antígeno (0,1 ml/dosis) por vía intraperitoneal a intervalos de 2 semanas (primera dosis con adyuvante completo de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol, segunda dosis con adyuvante incompleto de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol y tercera dosis sin ningún adyuvante). Se usó una cantidad igual de LicKM como control. Se recogieron muestras de sueros preinmunes 1 día antes de la primera dosis de antígeno. Doce (12) días después de cada inmunización, se obtuvieron muestras séricas de ratones individuales y se evaluaron los títulos de anticuerpo específico de RSV. El análisis de anticuerpo específico de antígeno del suero se realizó usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida. Las placas ELISA (Nunc Polysorp, Dinamarca) se recubrieron con 100 µl por pocillo (1,0 µg por pocillo) de cadena larga de RSV inactivado (Hy Test, 10 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato) durante una noche a temperatura ambiente (TA; aproximadamente 25 °C). Las placas recubiertas se lavaron 3x con PBS-Tween (0,05 %) y después se bloquearon con un 0,5 % de I-block (Tropix) en PBS-Tween a TA durante al menos 1 hora. Se añadió una serie de diluciones de los sueros a las placas (30 µl/pocillo) durante 2 a 4 horas a TA. Las placas después se lavaron 3x con PBS-Tween y se añadieron (100 µl por pocillo) anticuerpos secundarios conjugados con peroxidada (de cabra anti-IgG de ratón, molécula completa o cadena gamma específica), a una dilución final de 1:10.000 en PBS-Tween, durante 1 hora a TA. Las placas después se lavaron 5x con PBS-Tween y se añadió (100 µl/pocillo) sustrato OPD (Sigma Fast™) en tampón fosfato-citrato que contenía urea, durante 30 min. a TA en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M (50 µl por pocillo) y se midió el cambio de color resultante del anticuerpo específico unido a 490 nM en un lector de placa ELISA (Spectramax Plus³⁸⁴). Los resultados, expresados en unidades de D.O., se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 7: Modificación por ingeniería e inmunización experimental de ratones con LicKM-PAD4 que contenía el dominio cuatro de 145 aminoácidos de la proteína PA de ántrax:

La modificación por ingeniería de LicKM-PAD4 se realizó del siguiente modo:

Como ADN molde, se obtuvo el ADN plasmídico de *E. coli* que contenía el dominio cuatro completo (aminoácidos 621 a 760) del antígeno protector de ántrax del RMNC (Moayeri y col., 2004, Curr Opin Microbiol., 7(1): 19-24).

Para la clonación, se amplificó el dominio cuatro que codifica los aminoácidos 621 a 760 usando 5' GCACA-GATCTAATATTTTAAATAAGAGATAAACG 3' (SEC ID N° 16) y 5'GCACAAGCTT TCCTATCTCAT-AGCCTTTTT 3' (SEC ID N° 17) como cebadores 5' y 3'. El fragmento amplificado por PCR se digirió y se clonó en el vector final usando sitios de restricción únicos introducidos durante la reacción de PCR (sitio *Bgl*II en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3', respectivamente). El ADN diana se clonó en *E. coli*, vectores de expresión de agrobacterias y virus vegetales. Los resultados descritos en este ejemplo se obtuvieron usando LicKM-PAD4 donde el gen diana está clonado y expresado en el vector de virus vegetal D4.

Para la expresión, se inocularon plantas de tabaco con transcritos sintetizados *in vitro* de LicKM-PAD4. Los procedimientos de inoculación de las plantas siguen siendo los mismos que en el ejemplo anterior. Dos semanas después de la inoculación, se recogieron muestras tisulares para el análisis de la expresión de proteína diana así como para la recuperación. La proteína recombinante se reconoció por anticuerpos específicos para el antígeno protector de ántrax (Fig. 9).

5 Para inducir la respuesta inmune, se inmunizaron ratones balB/c hembra de ocho semanas de edad con 200 µg por dosis de LicKM-PAD4 recombinante modificada por ingeniería para expresar los 145 aminoácidos (aminoácidos 621 a 760 de la proteína PA) de la proteína PA de ántrax. Se administraron tres inmunizaciones de 0,1 ml por vía intraperitoneal a intervalos de 2 semanas (primera dosis con adyuvante completo de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol, segunda dosis con adyuvante incompleto de Freund (CFA) a una proporción 1:1, vol:vol y tercera dosis sin ningún adyuvante). Se usó una cantidad igual de LicKM como control. Se recogieron muestras de sueros preinmunes 1 día antes de la primera dosis de antígeno. Doce (12) días después de cada inmunización, se obtuvieron muestras séricas de ratones individuales y se evaluaron los títulos de anticuerpo específico de RSV. El análisis de anticuerpo específico de antígeno del suero se realizó usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida. Las placas ELISA (Nunc Polysorp, Dinamarca) se recubrieron con 100 µl por pocillo (1,0 µg por pocillo) de PA recombinante (10 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato) durante una noche a temperatura ambiente (TA; aproximadamente 25 °C). Las placas recubiertas se lavaron 3x con PBS-Tween (0,05 %) y después se bloquearon con un 0,5 % de I-block (Tropix) en PBS-Tween a TA durante al menos 1 hora. Se añadió una serie de diluciones de los sueros a las placas (30 µl/pocillo) durante 2 a 4 horas a TA. Las placas después se lavaron 3x con PBS-Tween y se añadieron (100 µl por pocillo) anticuerpos secundarios conjugados con peroxidada (de cabra anti-IgG de ratón, molécula completa o cadena gamma específica), a una dilución final de 1:10.000 en PBS-Tween, durante 1 hora a TA. Las placas después se lavaron 5x con PBS-Tween y se añadió (100 µl/pocillo) sustrato OPD (Sigma Fast™) en tampón fosfato-citrato que contenía urea, durante 30 min. a TA en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M (50 µl por pocillo) y se midió el cambio de color resultante del anticuerpo específico unido a 490 nM en un lector de placa ELISA (Spectramax Plus³⁸⁴). Los resultados, expresados en unidades de D.O., se muestran en la Figura 10.

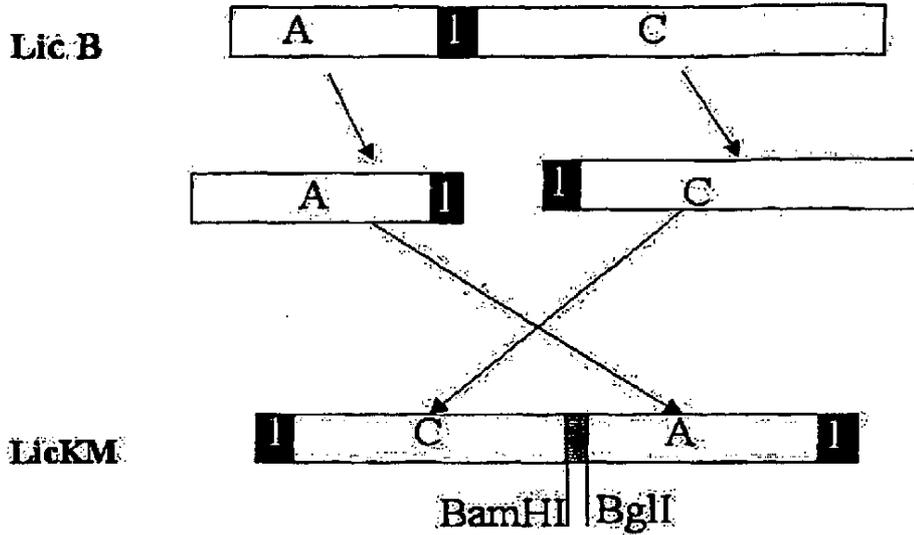
25 También se expresó LicKM-HbsAg en plantas. Se usan plantas de tabaco para producir antígenos diana como fusiones con proteína vehículo. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los especialistas en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, será obvio para los especialistas en la técnica que pueden usarse variaciones en estos procedimientos y composiciones y que se pretende que la invención pueda ponerse en práctica de otro modo al descrito específicamente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína vehículo que comprende:
 - 5 (a) un polipéptido de liquenasa B que consiste en un polipéptido con al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los aminoácidos 14-231 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 E y los aminoácidos 8-226 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 H; opcionalmente fusionado a
 - (b) una secuencia polipeptídica heteróloga que no se halla en el polipéptido de liquenasa B.
2. Una proteína vehículo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
 - 10 (a) un polipéptido de liquenasa B que consiste en un polipéptido con al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los aminoácidos 14-231 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1E y los aminoácidos 8-226 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1H; fusionado a
 - (b) una secuencia polipeptídica heteróloga que no se halla en el polipéptido de liquenasa B.
3. La proteína vehículo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que el polipéptido de liquenasa B consiste
 - 15 en un polipéptido con al menos un 90 % de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los aminoácidos 14-231 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 E y los aminoácidos 8-226 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1H.
4. La proteína vehículo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que el polipéptido de liquenasa B consiste
 - 20 en un polipéptido con al menos un 95 % de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los aminoácidos 14-231 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1E y los aminoácidos 8-226 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 H.
5. La proteína vehículo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido de liquenasa B tiene
 - 25 la secuencia de los aminoácidos 14-231 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1E o de los aminoácidos 8-226 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 H.
6. La proteína vehículo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la secuencia polipeptídica heteróloga comprende un factor de crecimiento; citoquina; ligando; receptor; inhibidor; antígeno; epítipo; epítipo de linfocito T; epítipo de linfocito B; anticuerpo; hidrolasa; proteína fluorescente verde; interferón; interleuquina; proteína asociada a patógeno; o toxina.
7. La proteína vehículo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la secuencia polipeptídica
 - 30 heteróloga comprende un antígeno de vacuna.
8. Un ácido nucleico que codifica la proteína vehículo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. El ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde el ácido nucleico comprende los nucleótidos 51-703 de la
 - 35 secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 B o los nucleótidos 37-697 de la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 G.
10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9.
11. El vector de expresión de la reivindicación 10, en donde el vector es un vector de virus vegetal.
12. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 10 u 11.
13. La célula huésped de la reivindicación 12, en donde la célula huésped es una célula vegetal.
14. Una proteína vehículo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en terapia.
- 40 15. La proteína vehículo para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la proteína vehículo es para su uso en la estimulación de una respuesta inmune en un animal.
16. Un procedimiento para la producción de una proteína vehículo en una planta que comprende:
 - 45 (a) proporcionar una planta que contiene un casete de expresión que tiene un ácido nucleico que codifica la proteína vehículo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 unido de forma funcional a un promotor de modo que la expresión del casete provoca la expresión de la proteína vehículo; y
 - (b) cultivar dicha planta en condiciones en que se expresa el ácido nucleico y se produce la proteína vehículo.
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el promotor se selecciona entre el grupo que consiste en
 - promotores constitutivos de plantas, promotores específicos de tejido vegetal y promotores de virus vegetales.

18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la proteína vehículo se expresa en una hoja, raíz o semilla de la planta.

A



B

```

5' GG AAT TCA GGA ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC gga tcc ATG GGC
GGT TCA TAT CCG TAT AAA AGC GGT GAA TAT CGT ACA AAA TCA TTT TTC GGA TAC
GGT TAT TAT GAA GTA AGA ATG AAA GCT GCC AAA AAC GTA GGA ATT GTT TCA TCT
TTC TTC ACT TAT ACA GGA CCT TCG GAC AAC AAT CCA TGG GAC GAA ATC GAT ATC
GAG TTT TTA GGA AAG GAC ACA ACT AAA GTT CAG TTC AAC TGG TAC AAA AAT GGA
GTC GGT GGA AAC GAG TAT TTG CAC AAT CTT GGA TTC GAT GCT TCC CAG GAT TTT
CAT ACA TAT GGA TTT GAA TGG AGG CCG GAT TAT ATA GAC TTC TAT GTT GAC GGC
AAA AAA GTT TAT CGT GGA ACC AGG AAC ATA CCT GTT ACT CCC GGC AAA ATT ATG
ATG AAT TTG TGG CCA GGA ATA GGA GTG GAT GAA TGG TTG GGA CGT TAC GAC GGA
AGA ACT CCT TTG CAG GCG GAG TAC GAA TAT GTA AAA TAC TAT CCT AAC GGT aga
tcc ATG GTG GTA AAT ACG CCT TTT GTT GCA GTG TTT TCG AAC TTT GAC TCC AGT
CAG TGG GAA AAA GCG GAT TGG GCG AAC GGT TCG GTG TTC AAC TGT GTT TGG AAG
CCT TCA CAG GTG ACA TTT TCG AAC GGT AAA ATG ATT TTG ACC CTT GAC AGG GAA
TAT aga tct3'
    
```

Figura 1

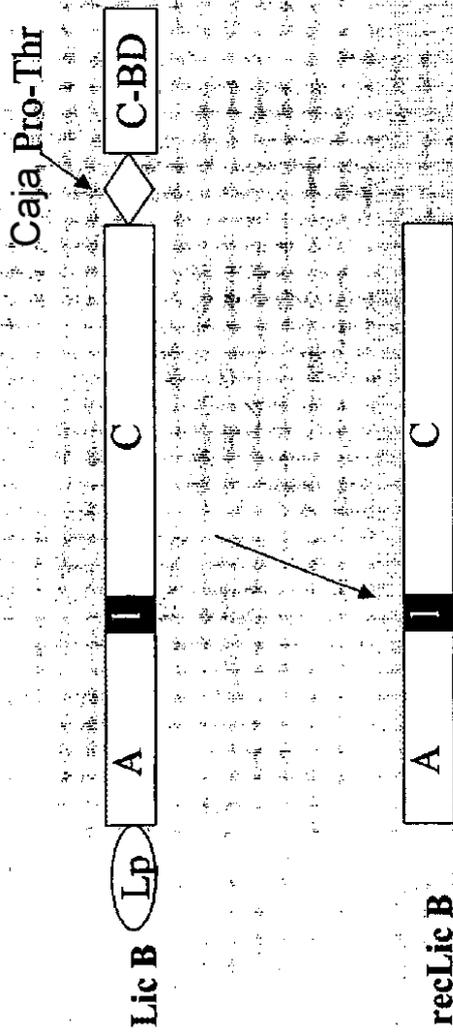


Figura 1 C

D

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCCGGGTCCGAGGGCCC
ATGGTAAATACGCCCTTTTGTGTCAGTGTTCGAACCTTTGACTCCAGTCAGTGGGAAAAAGCGGATTGG
GCGAACGGTTCGGTGTCAACTGTGTTTGAAGCCTTCACAGGTGACATTTTCGAACGGTAAAAATGATT
TTGACCCTTGACAGGGAATATGGCGGTTTCATATCCGTATAAAAAGCGGTGAATATCGTACAAAATCATT
TTCGGATACGGTTATTATGAAGTAAGAAATGAAAGCTGCCAAAAACGTAGGAATTGTTTCATCTTTCTTC
ACTTATACAGGACCTTCGGACAACAATCCATGGGACGAAATCGATATCGAGTTTTTAGGAAAGGACACA
ACTAAAGTTCAGTTCAACTGGTACAAAAATGGAGTCGGTGGAAACGAGTATTTGCACAATCTTGGATTC
GATGCTTCCCAGGATTTTCATACATATGGATTTGAATGGAGGCCGGATTATATAGACTTCTATGTTGAC
GGCAAAAAGTTTATCGTGGAACCAGGAACATACCTGTTACTCCCGCAAAAATTATGATGAATTTGTGG
CCAGGAATAGGAGTGGATGAATGGTGGGACGTTACGACGGAAGAACTCCTTTGCAGGCGGAGTACGAA
TATGTAATACTATCCTAACGGTGTTCGCAAGATAATCCTACTCCTACTCCTACGATTGCTCCTTCT
ACTCCGAGATCTATCTAGA

E

MRGSHHHHHHGSMSGSYPKSGEYRKSFFGYGYEVRMKAANKVGISSFFTYTGPSDNNPWDEIDIE
FLGKDTTKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQDFHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYRGNIPVTPGK
IMMNLWPGIGVDEWLGRYDGRTPLOAEYEVKYPNGRSMVNTPFVAVFSNFDSSQWEKADWANGSVF
NCVWPKSQVTFNSGKMILTLDREYRSI

F

MRGSHHHHHHGSACELGTPGRGPMVNTPFVAVFSNFDSSQWEKADWANGSVFNCVWPKSQVTFNSGKMI
LTLDREYGGSYPKSGEYRKSFFGYGYEVRMKAANKVGISSFFTYTGPSDNNPWDEIDIEFLGKDT
TKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQDFHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYRGNIPVTPGKIMMNLW
PGIGVDEWLGRYDGRTPLOAEYEVKYPNGVPODNPTPTIAPSTPRSI

Figura 1

G

GGATCCTTAATTAAAATGCACCATCACCATCACCATGGCGGTTCATATCCGTATAAAAAGCGGTGAATAT
CGTACAAAATCATT~~TTTC~~CGGATACGGTTATTATGAAGTAAGAATGAAAGCTGCCAAAAACGTAGGAATT
GTTTCATCTTTCTTCACTTATACAGGACCTTCGGACAACAATCCATGGGACGAAATCGATATCGAGTTT
TTAGGAAAAGGACACAAC~~TAAAGTT~~CAGTTCAACTGGTACAAAAATGGAGTCGGTGGAAACGAGTATTTG
CACAACTCTGGATTTCGATGCTTCCCAGGATTTTCATACATATGGATTTGAATGGAGGCCGGATTATATA
GACTTCTATGTTGACGGCAAAAAAGTTTATCGTGGAAACCAGGAACATACCTGTTACTCCCGGCAAAATT
ATGATGAATTTGTGGCCAGGAATAGGAGTGGATGAATGGTTGGGACGTTACGACCGGAAGAACTCCTTTG
CAGGCGGAGTACGAATATG~~TAAAATACTATCCTAACGGTAGATCTGAATTC~~AAGCTTGTGGTAAATACG
CCTTTTGTTCAGTGT~~TTTC~~GAACTTTGACTCCAGTCAGTGGGAAAAAGCGGATTGGGCCGAACGGTTCG
GTGTTCAACTGTGTTTGAAGCCTT~~CACAGGTGACATTTTC~~GAAACGGTAAAATGATTTTGACCCTTGAC
AGGAATAFTGACTCGAGCTC

H

M~~HHHHH~~HGGSSYPYKSGEYRTKSF~~FGYGYE~~V~~RMKAAK~~NVGI~~VSSFF~~TYTGPSDNNPWDEIDIEFLGKDT
TKVQFNWYKNGVGGNEYLHNLGFDASQDFHTYGFWRPDYIDFYVDGKKVYR~~TRNI~~PVTPGKIMMNLW
PGIGVDEWLGRYDGRTP~~LQAEYEYVKYYP~~NGRSEFKLVNTPFVAVFSNFDSSQWEKADWANGSVFNCV
WKPSQVTF~~SNGKMI~~LTLDREY

Figura 1

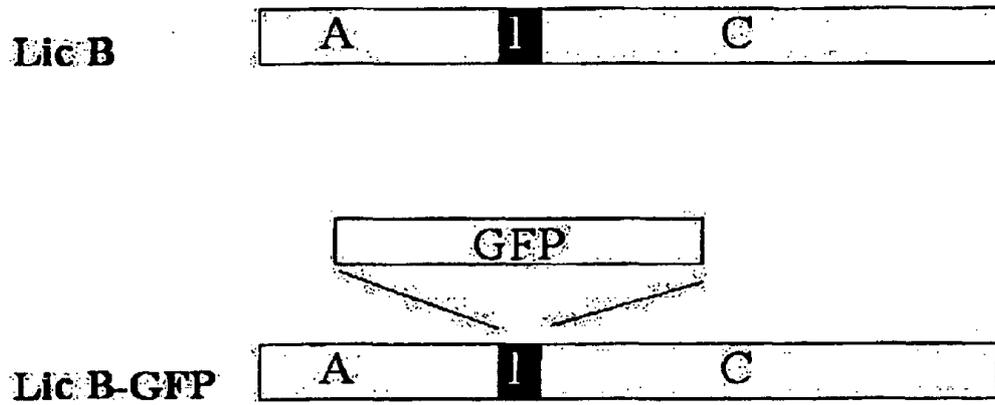


Figura 2

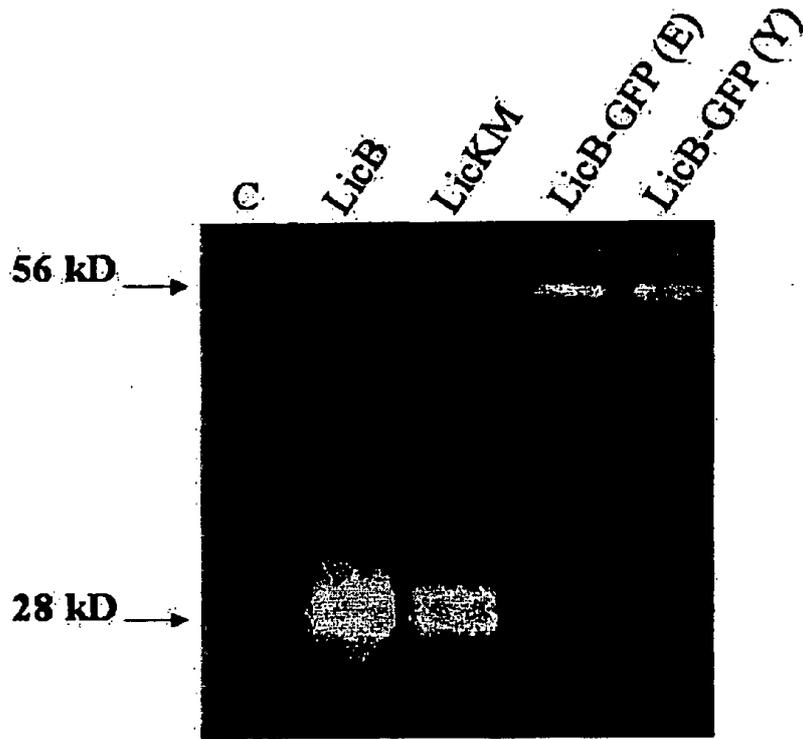


Figura 3

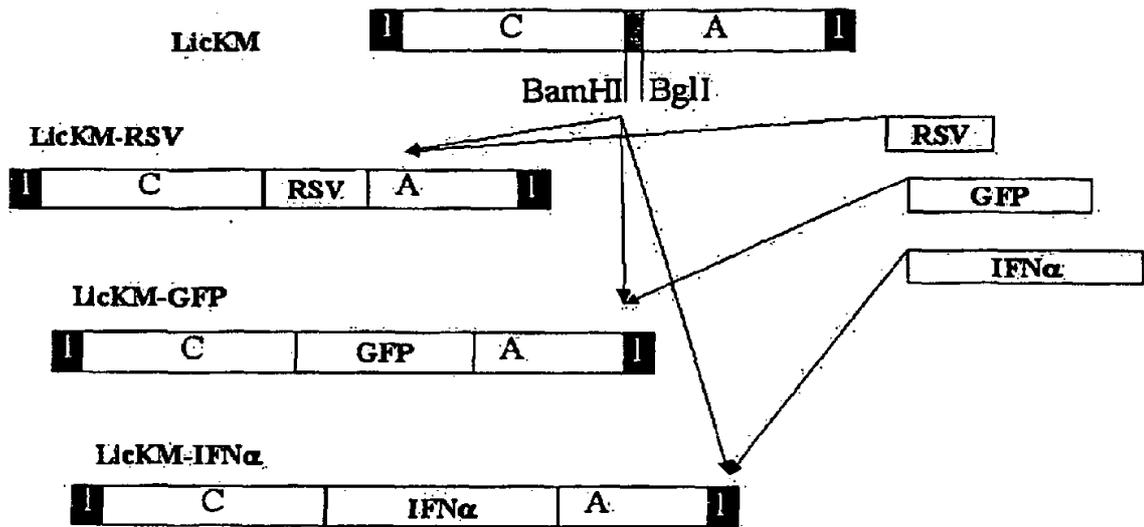
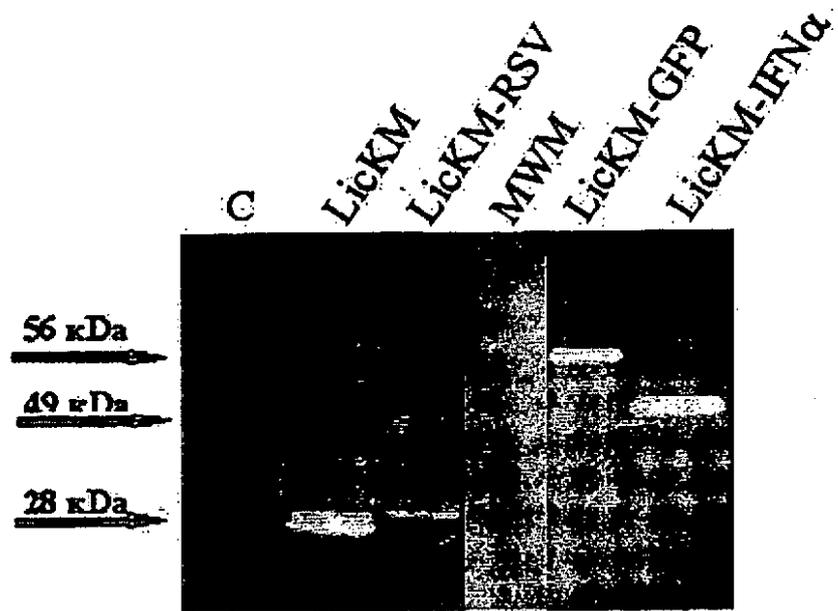


Figura 4

A



B

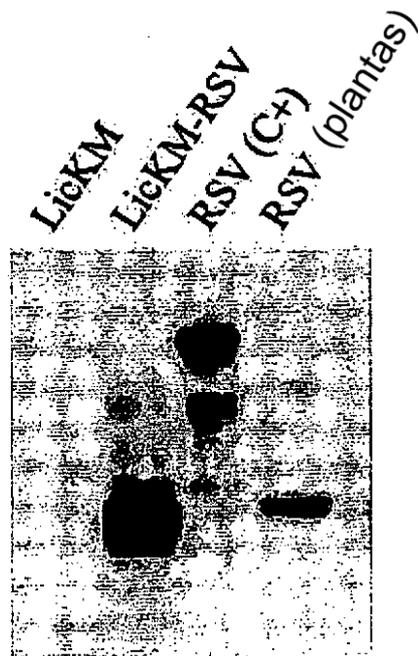


Figura 5

Respuesta de anticuerpos (IgG) séricos específicos del péptido G de RSV de ratones inmunizados i.p. con LicKM-RSV

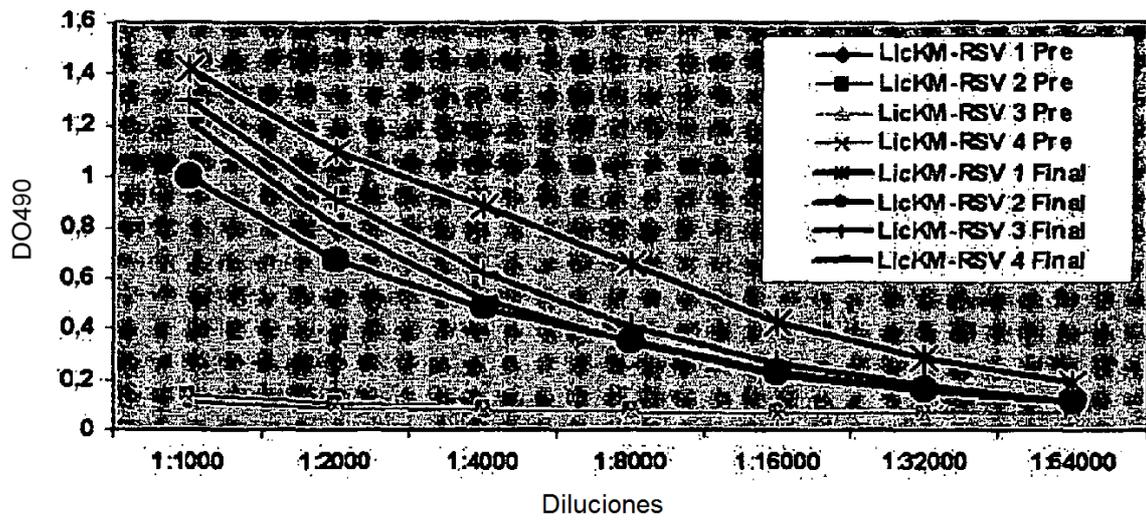


Figura 6

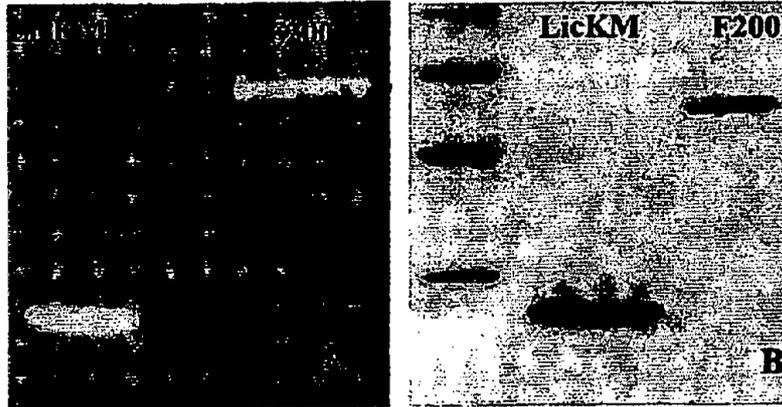


Figura 7

Respuesta de anticuerpos (IgG) séricos específicos del péptido F de RSV de ratones inmunizados i.p. con LicKM-F200

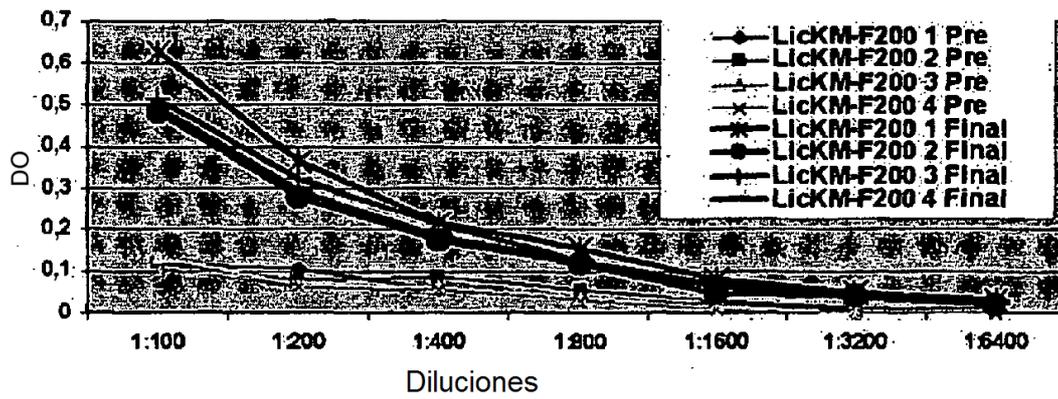


Figura 8

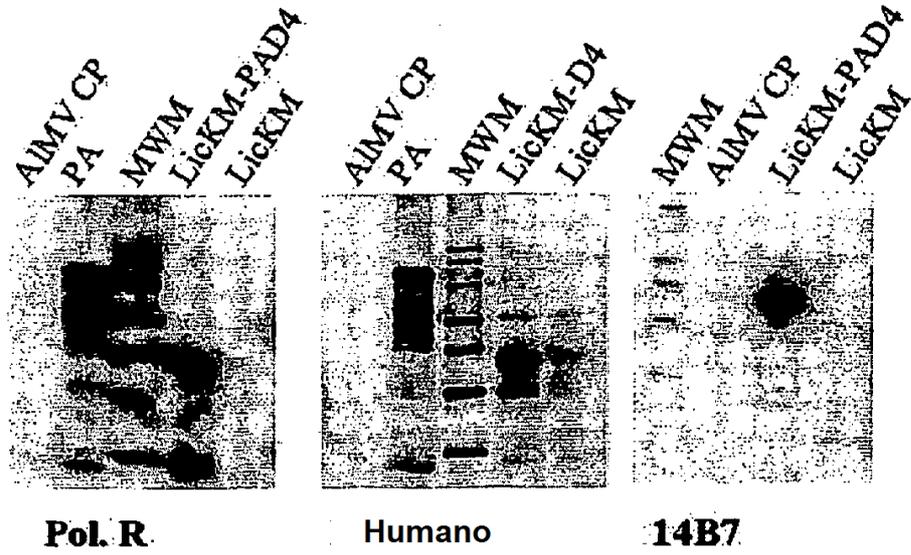


Figura 9

Respuesta de anticuerpos (IgG) séricos específicos del dominio 4 de PA de ántrax de ratones inmunizados i.p. con LicKM-PAD4

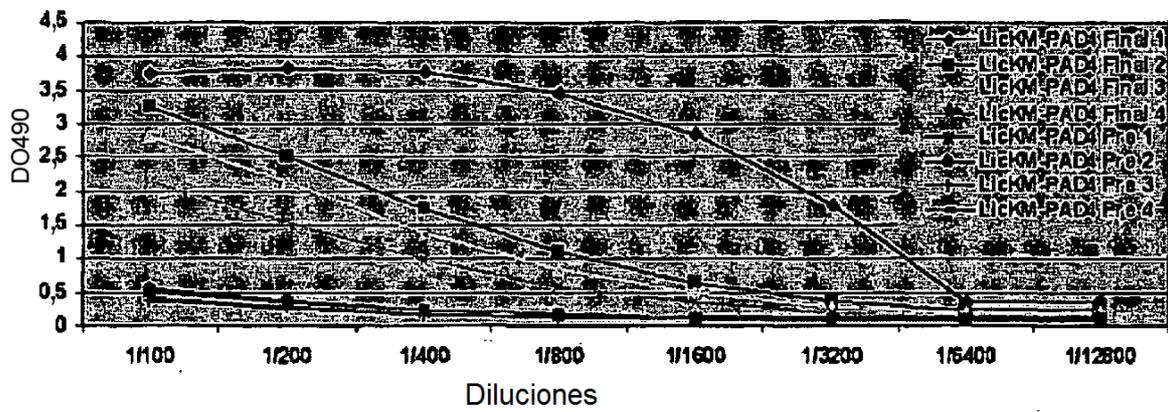


Figura 10