

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 941**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2010 E 10305473 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2385130**

54 Título: **Método para la producción de proteínas recombinantes a partir de raíces pilosas de plantas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE
(100.0%)
Chemin du Thil
80025 Amiens , FR**

72 Inventor/es:

**BOITEL-CONTI, MICHÈLE;
HUET, YOANN;
GUERINEAU, FRANÇOIS y
ELE EKOUNA, JEAN-PIERRE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 941 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

Método para la producción de proteínas recombinantes a partir de raíces pilosas de plantas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para la secreción de proteínas recombinantes a partir de raíces pilosas transgénicas, en particular raíces pilosas transgénicas obtenidas a partir de plantas pertenecientes a la familia Brassicaceae.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas son biopolímeros de aminoácidos sintetizados por todos los organismos vivos. Están implicadas en prácticamente todos los aspectos de la vida de la célula. Las enzimas dirigen y regulan el metabolismo, las proteínas estructurales dan forma a las células, los receptores y las proteínas de señalización integran los cambios medioambientales. Hoy en día, las proteínas son utilizadas ampliamente no sólo en el campo industrial (enzimas en polvo de lavado, aditivos alimentarios, agentes de blanqueo de papel...), sino también para aplicaciones médicas (vacunas y alérgenos, hormonas, anticuerpos...). Antes del desarrollo de la biología molecular y de las herramientas de la tecnología de ADN recombinante, la única fuente de proteínas de interés se mantenía en el propio organismo productor. De hecho, la insulina fue purificada primeramente de cerdos, mientras que la hormona del crecimiento humana se extrajo de tejidos de cadáveres humanos. Los principales inconvenientes de estos enfoques eran la disponibilidad limitada de material de partida y el contenido bastante bajo de la proteína de interés. Por otra parte, el riesgo de contaminación viral relativa a proteínas con aplicaciones médicas se mantuvo alto, especialmente cuando se extrajeron de tejidos humanos. En los años 80, la tecnología de ADN recombinante proporcionó alternativas a este tipo de problemas al permitir la producción en exceso de proteínas foráneas (proteínas recombinantes) en un organismo anfitrión determinado. De hecho, la insulina animal fue la primera proteína recombinante con aplicación médica que fue producida en la bacteria *E. coli*. En el momento actual, los cultivos de células animales y *E.coli* son las dos referencias para la bioproducción de proteínas recombinantes.

25 Sin embargo, las bacterias son incapaces de producir proteínas complejas (glicosilada) y el cultivo de células animales es un procedimiento bastante caro que no puede excluir el riesgo de contaminación por virus animales. De este modo emergieron sistemas alternativos de bioproducción durante las últimas dos décadas, incluyendo plantas que se consideran que son seguras (no hay riesgo viral), capaces de producir proteínas complejas y poco costosas para crecer. Se prefiere el confinamiento de los sistemas de bioproducción de origen vegetal (en invernaderos para toda la planta, o biorreactores para cultivos de células y órganos vegetales) a las plantas cultivadas en el campo. Las raíces pilosas son un ejemplo de tal sistema de bioproducción confinado, ya que se pueden cultivar fácilmente en biorreactores y se pueden obtener los clones transgénicos para cualquier gen de interés. Este sistema de raíces concreto se genera después de la infección de la célula vegetal por *Agrobacterium rhizogenes* que naturalmente transfiere diversos genes bacterianos (genes *rol*) al genoma de la planta. Estos genes *rol* obligan a la célula vegetal infectada (de la raíz, hoja ...) a seguir un nuevo programa de desarrollo que conduce a la formación en el lugar de la infección de un nuevo sistema radicular: las raíces pilosas. *A. rhizogenes* puede ser modificado genéticamente con el fin de realizar la transferencia de un gen de interés (que codifica un agente biofarmacéutico) para la producción de raíces pilosas transgénicas. El tabaco (*Nicotiana tabacum*) es, con mucho, la especie vegetal más utilizada en gran parte para la producción de proteína recombinante pero se demostró que otros eran adecuados (Daniell et al., Trends in Plant Science, 2009). De hecho, es una especie bien caracterizada, que se utiliza principalmente en el ámbito académico y de la investigación aplicada. Se demostró que las raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* eran capaces de producir y secretar no sólo la proteína GFP recombinante modelo sino también diversas proteínas relevantes para aplicaciones terapéuticas en la salud humana.

Por ejemplo, el trabajo previo de Medina-Bolívar (Medina-Bolívar *et al.*, 2004) mostró la acumulación de eGFP en el medio de cultivo de raíces de *Nicotiana tabacum* a 0,8 mg/L después de 21 días.

45 Más recientemente, Woods *et al.* (Woods, et al. 2008, BMC Biotechnology, 8:95) han producido acetilcolinesterasa humana a partir de cultivos de órganos de raíces pilosas de *Nicotinia benthamiana*.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método para obtener una proteína recombinante a partir de raíces pilosas que comprende las etapas de:

50 a) transformar una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* y/o con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden los genes *rol*;

y

b) transformar dicha planta con un vector que contiene una casete de expresión que comprende un péptido señal y un gen que codifica dicha proteína recombinante;

en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae.

También se describen cultivos de raíces pilosas obtenibles mediante las etapas de transformación descritas anteriormente.

5 La memoria descriptiva describe un medio de cultivo que contiene una proteína recombinante obtenible mediante el método descrito anteriormente.

La memoria descriptiva describe adicionalmente a una proteína recombinante obtenible mediante el método descrito anteriormente.

10 De hecho, los autores de la invención han descubierto que las raíces pilosas obtenidas mediante la transformación de una planta perteneciente a la familia Brassicaceae con *Agrobacterium rhizogenes* son capaces de secretar grandes cantidades de proteína recombinante al medio extracelular. Como alternativa, se puede sustituir *Agrobacterium rhizogenes* por *Agrobacterium tumefaciens*, en presencia de los genes *rol*, conocidos por inducir la formación de raíces pilosas.

15 Una ventaja de la presente invención es la simplificación de la recuperación y el procesamiento aguas abajo de la proteína recombinante. Otra ventaja es que la biomasa de las raíces no se destruye para la recuperación de proteínas y que se puede utilizar un cultivo dado para varios ciclos de producción de dicha proteína recombinante. A diferencia de las plantas cultivadas en campos en los que los factores ambientales (cambios de temperatura, sequía, ataques de plagas, uso plaguicidas/herbicidas ...) pueden afectar considerablemente al nivel de producción de la proteína recombinante, las condiciones de cultivo de raíces transgénicas en biorreactores están controladas y normalizadas que lleva a una producción homogénea entre los diferentes lotes. Por otra parte, las raíces no producen polen y no pueden sobrevivir fuera del biorreactor, lo que elimina el riesgo de difusión del transgén en el medio ambiente.

20 El uso de especies de plantas comestibles durante varios cientos de años en la nutrición humana/animal es un buen indicador de su naturaleza inofensiva. En contraste con el tabaco, que se ha utilizado ampliamente en el pasado para este tipo de aplicación, y que pertenece a la familia de las solanáceas bien conocida por la capacidad de varios de sus miembros de especies para producir compuestos potencialmente tóxicos (alcaloides), incluyendo la nicotina.

25 El uso de un sistema de raíces de plantas comestibles para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas reduce de este modo los problemas de seguridad relacionados con la materia prima de partida antes de la purificación de las proteínas (sin virus animales).

30 Des este modo, de manera ventajosa, el método de la invención permite la obtención de altos niveles de proteínas recombinantes, con costes de purificación/procesamiento de aguas abajo reducidos, permite una nueva formulación para productos biofarmacéuticos liberados oralmente y reduce los problemas de seguridad para la salud humana y el medio ambiente.

Descripción detallada de la invención

35 En un aspecto, la invención se refiere a un método para la secreción de una proteína recombinante a partir de raíces pilosas que comprende las etapas de:

a) transformar una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* y/o con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende los genes *rol*;

y

40 b) transformar dicha planta con un vector que contiene una casete de expresión que comprende un péptido señal y un gen que codifica dicha proteína recombinante;

en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae.

En una realización preferida, se utiliza una cepa de *Agrobacterium rhizogenes*.

45 En otra realización, se utiliza una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. En esta realización, la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* es capaz de inducir la formación de raíces pilosas si alberga un plásmido pRi que comprende los genes *rol*.

Típicamente, las etapas a) y b) se realizan simultáneamente.

En una realización, la propia cepa de *Agrobacterium* contiene una casete de expresión que comprende un gen que codifica la proteína recombinante.

En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo antes de la etapa a).

En esta realización, las raíces pilosas se pueden obtener mediante la transformación de una planta transgénica que expresaba el gen de interés con una cepa de *Agrobacterium* en condiciones que inducen la formación de raíces pilosas.

5 Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en donde la etapa a) y la etapa b) se llevan a cabo simultáneamente mediante la transformación de dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes*, en donde dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* contiene un casete de expresión que comprende un gen que codifica dicha proteína recombinante.

10 En otras palabras, la invención se refiere a un método para obtener una proteína recombinante a partir de raíces pilosas que comprende la etapa de transformar una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes*, en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae y en donde dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* contiene un casete de expresión que comprende un péptido señal y un gen que codifica dicha proteína recombinante.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "planta perteneciente a la familia Brassicaceae" tiene su significado general en la técnica. Éste incluye cualquier planta de la familia Brassicaceae, también conocida como crucíferas, familia de la mostaza o familia de la col.

15 Contiene más de 330 géneros y aproximadamente 3.700 especies, de acuerdo con Royal Botanic Gardens, Kew.

20 Los géneros más grandes son *Draba* (365 especies), *Cardamine* (200 especies, pero su definición es controvertida), *Erysimum* (225 especies), *Lepidium* (230 especies) y *Alyssum* (195 especies.) Especies bien conocidas: *Brassica oleracea* (repollo, coliflor, etc.), *Brassica rapa* (nabo, col china, etc.), *Brassica napus* (colza, etc.), *Raphanus sativus* (rábano común), *Armoracia rusticana* (rábano picante), *Matthiola* (alhelí), *Arabidopsis thaliana* (organismo modelo) y muchos otros. Entre estas especies, algunas producen raíces comestibles (nabo, rábano...).

En una realización preferida, dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae se selecciona del grupo que consiste de *Raphanus sativus*, *Raphanus sativus* var. *niger*, *Brassica oleracea* L. Convar, *Brassica rapa* y *Arabidopsis thaliana*.

Incluso más preferiblemente, dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae es *Brassica rapa*

25 La transformación por *Agrobacterium rhizogenes* y/o *Agrobacterium tumefaciens* es un mecanismo bien conocido en la técnica. El experto está familiarizado con los diferentes mecanismos comúnmente empleados para llevar a cabo dicha etapa de transformación. De acuerdo con la especie que se vaya a transformar, se pueden utilizar para la infección diferentes partes de la planta (hipocótilos, hojas, etc.). Típicamente, la infección por *Agrobacterium rhizogenes* y/o *Agrobacterium tumefaciens* se lleva a cabo mediante la aplicación de un inóculo de *Agrobacterium rhizogenes* y/o *Agrobacterium tumefaciens* para sembrar los tejidos que han sido heridos anteriormente.

30 Se pueden utilizar varias cepas de *Agrobacterium rhizogenes* para llevar a cabo la invención. Las cepas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la cepa TR7 de *Agrobacterium rhizogenes*, también conocida como ATCC 25818 y las cepas LBA 9402, A4T, A4, LBA1334, ATCC 11325, ATCC 15834 y LMG 155.

En una realización preferida, dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* es la cepa ATCC 25818.

35 Se pueden utilizar varias cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para llevar a cabo la invención. Las cepas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, *A. tumefaciens* C58, C58C1, LBA4404, GV2260, GV3100, A136, GV3101, GV3850, EHA101, EHA105, AGL-1.

40 La expresión "genes *rol*" según se utiliza en la presente memoria tiene su significado general en la técnica. Se refiere al grupo de genes bacterianos que son capaces de inducir la formación de raíces pilosas (Schmülling *et al.*, 1988; Bulgakov *et al.*, 2008 y sus referencias). Típicamente, los genes *rol* están albergados por un plásmido tal como un plásmido PRI.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "casete de expresión" tiene su significado general en la técnica. Se refiere a un constructo de ácido nucleico, que, cuando está presente en una célula dada en condiciones adecuadas, permite la expresión de un gen de interés. De acuerdo con la presente invención, dicho gen de interés es el gen que codifica una proteína recombinante que se desea producir y recoger.

La casete de expresión puede estar contenida en cualquier vector de expresión adecuado. Típicamente, la expresión puede ser un vector binario, tal como el vector binario pRD400, que ha sido modificado para incluir el gen que codifica la proteína recombinante de interés.

50 En una realización, dicha casete de expresión comprende un promotor, un péptido señal, un gen que codifica dicha proteína recombinante y una secuencia de poliadenilación.

En una realización, el promotor es un promotor derivado de un virus que infecta plantas Brassicaceae (virus del mosaico de la coliflor).

En una realización preferida, dicho promotor es el promotor CaMV35S.

En una realización, dicho promotor es un promotor inducible por calor o por nutrientes, tales como los promotores de la proteína de choque térmico (HSP) y del factor de transcripción (HSF) de *Arabidopsis* (William R Swindell *et al.*, 2007) o el promotor del gen At2g33830 de *Arabidopsis*.

5 De acuerdo con la presente invención, la casete de expresión comprende un péptido señal. En una realización, dicho péptido señal es un péptido señal nativo incluido en el gen que codifica la proteína recombinante que va a ser expresada y secretada. En una realización alternativa, dicho péptido señal deriva de una planta Brassicaceae. En una realización preferida, dicho péptido señal es un péptido señal de la pectina metilesterasa AT1G69940 de *Arabidopsis* o una variante de la misma que difiere en una sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, típicamente la adición de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. En una realización preferida, dicho péptido señal es el péptido señal mostrado en el SEQ ID NO: 1.

10 El método de la invención es adecuado para la obtención de cualquier tipo de proteína recombinante. Según se utilizan, las expresiones "proteína recombinante" o "proteína heteróloga" o "proteína de interés" se utilizan indistintamente para referirse a una proteína que normalmente no es expresada por la planta que pertenece a la familia Brassicaceae, o no se expresa a niveles significativos.

15 Las proteínas recombinantes adecuadas de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, alérgenos, vacunas, enzimas, inhibidores de enzimas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, antígenos, toxinas, péptidos antimicrobianos, hormonas, factores de crecimiento, proteínas de la sangre (tales como albúmina, factores de coagulación, transferrina), receptores y proteínas de señalización, componentes proteicos de patrones biomédicos, componente proteicos de medios de cultivo celulares, proteínas de fusión o etiquetadas, péptidos y proteínas ricos en cisteína (puentes disulfuro), y proteínas vegetales glicosilada (tales como lectinas, papaína ..).

20 En una realización preferida, dicha proteína recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos (Fv de cadena sencilla ...), antígenos especialmente de fuentes bacterianas, víricas o fúngicas, alérgenos, inmunorreguladores, enzimas digestivas y proteínas liberadas oralmente con uso terapéutico (lipasa, pepsina ...).

25 También se describe un cultivo de raíces pilosas obtenible mediante:

a) transformación de una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* y/o con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden los genes *rol*;

y

30 b) transformación de dicha planta con un vector que contiene una casete de expresión que comprende un gen que codifica dicha proteína recombinante;

en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae.

35 También se describe un cultivo de raíces pilosas obtenible mediante la transformación de una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes*, en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae y en donde dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* contiene una casete de expresión que comprende un gen que codifica dicha proteína recombinante, en donde dicha transformación se define como antes.

En una realización, el medio de cultivo que contiene dicho recombinante se recoge y se utiliza directamente para aplicaciones futuras.

40 También se describe un medio de cultivo de raíces pilosas que contiene una proteína recombinante, obtenible mediante el método descrito anteriormente.

Ventajosamente, el medio de cultivo que contiene la proteína recombinante es adecuado para uso oral en seres humanos y/o animales sin ninguna etapa de purificación.

45 En una realización alternativa, la proteína recombinante se obtiene después de una o varias etapas de purificación. Típicamente, el medio de cultivo primero se puede aclarar primero mediante filtración convencional o centrifugación a baja velocidad con el fin de eliminar los fragmentos celulares. La proteína de interés se hace precipitar a continuación, por una alta concentración de sal y se somete a diálisis o se fija directamente sobre una columna de cromatografía de afinidad. La proteína recombinante concentrado se puede liofilizar a continuación o se puede almacenar en un tampón de almacenamiento adecuado a baja temperatura.

50 Los protocolos adecuados adaptados a cada proteína recombinante obtenible de acuerdo con la invención y a cada tipo de aplicación previsto son mecanismos convencionales en la técnica, y el experto en la técnica seleccionará fácilmente la etapa o etapas de purificación apropiadas, si las hubiera, para la aplicación deseada.

También se describe una proteína recombinante obtenible mediante el método definido anteriormente. Ventajosamente, dicha proteína recombinante tiene una pureza de al menos 20%, preferiblemente al menos 25%, incluso más preferiblemente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%. En particular, carece de proteínas animales y patógenos animales (virus, priones ...).

- 5 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no se deben interpretar en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1: representación esquemática del plásmido pRD400 que codifica 6XHis-eGFP (pRD400-gfp).

- 10 Figura 2: cuantificación de 6XHis-eGFP tejido transgénicos de raíces pilosas de especies de *Brassica rapa* (VER) y *Nicotiana tabacum* (NT).

Figura 3: contenido intracelular de eGFP en las diferentes partes de la biomasa de raíces cultivadas para las especies VER y NT. La parte central (zona 1) contiene los tejidos más antiguos, mientras que la parte periférica (zona 3) está compuesta por los tejidos de la raíz jóvenes en crecimiento. La zona 2 es una parte intermedia. El análisis se realizó para determinar la biomasa de las raíces cultivadas durante 20 o 40 días.

- 15 Figura 4: Secreción de 6XHis-eGFP a lo largo del tiempo en cultivos de raíces de VER y NT.

(A) Se tomaron muestras de 26 µl de medio de cultivo de raíz de Ver o Nt en los momentos indicados en el curso del cultivo y se analizaron en gel de acrilamida al 12,5%. Las proteínas secretadas totales se revelaron por medio de una tinción de Coomassie. Se cargaron 500 ng de 6XHis-eGFP expresada bacterianamente en el mismo gel como control cuantitativo y cualitativo. M: marcador molecular.

- 20 (B) La concentración de 6XHis-eGFP secretada de las mismas muestras que el panel A se determinó mediante mediciones de fluorescencia.

Figura 5: Análisis de transferencia Western de la producción de 6XHis-eGFP intra- y extracelular para cultivo de raíces de VER y TOU.

- 25 Se analizaron los extractos de proteínas solubles totales (intra o extracelulares) de clones de raíces pilosas que expresan 6XHis-eGFP de TOU y VER mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-GFP primario. Se cargaron 50 µg de proteínas solubles para cada extracto de proteína total de la raíz. Para la detección de 6XHis-eGFP secretada, se cargaron proteínas precipitadas de TCA a partir de 6 ml del medio de cultivo. TOU_{WT} es un clon de raíz pilosa de tipo salvaje que no ha sido transformado con el constructo pRD400-gfp. TOU₁ y TOU₂ son dos clones independientes de la especie TOU que expresan 6XHis-eGFP. TOU₁ es un cultivo de raíz de 21 días de edad, mientras que todos los demás clones se cultivaron durante 10 días. Se cargaron 100 ng de 6XHis-eGFP pura disponible en el mercado como control cuantitativo y cualitativo.
- 30

Figura 6: Comportamiento de secreción de 6XHis-eGFP para cultivos de raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* (Nt) y las tres especies comestibles *Brassica rapa* (Ver), *Spinacia oleracea* (MAT) y *Daucus carota* (TOU), tal como se determina por mediciones de fluorescencia.

- 35 Figura 7: Se cuantificó la 6XHis-eGFP secretada mediante fluorometría en el medio de cultivo de clones independientes de 20 días de edad. El número de identificación de cada clon independiente se indica en el eje de abscisas. *Brassica rapa* (VER), *Raphanus sativus* var. *niger* (NOI), *Raphatius sativus* (CER) y *Brassica oleracea* L. *Convar* (QUI) pertenecen a la familia Brassicaceae, mientras *Nicotiana tabacum* (Nt) pertenece a la familia de las solanáceas. No están representados en este gráfico los clones de *Daucus carota* (TOU) de la familia Apiaceae, que no producen ningún nivel detectable de 6XHis-eGFP secretada.
- 40

Ejemplos

I. Material y métodos

A. plásmido binario recombinante para la expresión 6XHis-eGFP

- 45 La secuencia codificante de 6XHis-eGFP (p6XHis-eGFP, Clontech) se clonó en los sitios de restricción Asp718 y BamHI del vector de expresión vegetal pRD400 (Datla et al., 1992), en marco con la etiqueta 6Xhis y la secuencia señal de secreción de la pectina metilesterasa AT1G69940 de Arabidopsis. Con el fin de mejorar la escisión del péptido señal, se añadió un dipéptido DP C-terminal a la secuencia del péptido señal de origen natural para dirigir MGYTNVSILLGLLMVFTPMVFADP (SEQ ID NO: 1). La expresión génica es impulsada por un promotor CaMV35S duplicado para 6XHis-eGFP y un promotor Nos para el marcador seleccionable nptII (resistencia a la
- 50 kanamicina). El plásmido resultante, pRD400-GFP tiene la secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 2.

Un cepa A. rhizogenes ATCC 25818 se había transformado mediante electroporación con el plásmido pRD400 vacío o que codificaba 6XHis-eGFP (pRD400-gfp) (véase la Figura 1).

B. Producción, selección y cultivo de raíces pilosas transgénicos

1. Especies de plantas y cultivo in vitro

Las siguientes familias y especies de plantas (abreviatura en paréntesis) se utilizaron para la producción de raíces pilosas:

5 familias de plantas	17 especies de plantas (abreviatura del nombre de la especie)
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> (TOU)
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> (BRU)
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i> (CER), <i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i> (NOI), <i>Brassica oleracea</i> L. Convar (QUI), <i>Brassica rapa</i> (VER)
Chenopodiaceae	<i>Spinacia oleracea</i> (MAT)
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> (Nt)

5

Las semillas fueron adquiridas de Gondian (www.gondian.com). Se esterilizaron superficialmente con etanol del 70% durante 5 min, lejía al 7% durante 10 min y se lavaron 5 veces con agua estéril antes de colocarlas en un medio sólido MS de fuerza media de pH 5,8 con un suplemento de sacarosa al 1%. La germinación y el crecimiento de plántulas se produjeron a 22°C con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

10

2. Infección de plantas por *Agrobacterium rhizogenes*

Los autores de la presente invención utilizaron la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* TR7 (ATCC 25818) proporcionada por BCCM™/LMG Bacteria Collection, Laboratorium Voor Microbiologie, Universiteit Gent. *Agrobacterium rhizogenes* se cultivó en placas MGL (2,5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de triptona, 5 g/l de manitol, 5 g/l de NaCl, 1,16 g/l de Na-glutamato, 0,25 g/l de KH₂PO₄, 0,1 g/l de MgSO₄, 1,0 mg/l de biotina, 8 g/l de agar, pH 7,0) eventualmente con un suplemento de 50 mg/l de kanamicina para la selección del plásmido binario. Los inóculos se prepararon a partir de 20 ml de cultivo bacteriano líquido desarrollado durante la noche a 25°C en medio MGL. La suspensión se centrifugó durante 5 min a 15.000 rpm y las células recogidas se resuspendieron en medio MGL de nueva aportación y se diluyeron hasta obtener una densidad óptica de $1 \pm 0,1$ a 600 nm.

La infección de las plantas (a excepción de *Nicotiana tabacum* y *Daucus carota*) se llevó a cabo pinchando con una aguja los hipocotilos de las plántulas de 3-10 días de edad y aplicando el inóculo de *Agrobacterium* con un hisopo de algodón estéril sobre la zona lesionada. Dependiendo de la especie de planta, las raíces pilosas emergieron desde el sitio dañado de 2 a 5 semanas después de la infección.

Para *Nicotiana tabacum*, se cortaron por el pecíolo hojas jóvenes de plantas de 4 semanas de edad desarrolladas asépticamente sobre medio sólido MS de fuerza media con un suplemento de sacarosa al 1% y se transfirieron como piezas completas a medio sólido MS de fuerza media pH 5,8 con un suplemento de sacarosa al 3%. La vena central principal se seccionó a continuación longitudinalmente, partiendo del centro de la hoja hacia la extremidad del pecíolo. A continuación se aplicó el inóculo de *Agrobacterium* sobre la zona lesionada como se ha descrito anteriormente. Después de 4 días, las hojas se transfirieron a medio MS sólido con un suplemento de sacarosa al 3% y 300 mg/l de cefotaxima sódica (medio MS3cef) con el fin de deshacerse de la *Agrobacteria*. Emergieron numerosas raíces pilosas de *Nicotiana tabacum* de la vena central de después de aproximadamente 4 semanas.

Para *Daucus carota*, las 2 primeras hojas de plántulas de 10-14 días de edad se dañaron en la extremidad de 3-4 folíolos utilizando un fórceps e inmediatamente se pintaron con un hisopo de algodón estéril empapado previamente en el inóculo de *Agrobacterium*.

3. Selección y cultivo de clones de raíces pilosas que expresan 6XHis-eGFP

Se cortaron hipocotilos infectados que desarrollaban las raíces pilosas de las plántulas y se colocaron sobre medio MS3cef. Después de 7-10 días, se transfirieron de 15 a 40 puntas de las raíces pilosas independientes (con excepción de MAT para la que solo se encontraban disponibles 5 clones independientes) a medio sólido MS3cef de nueva aportación donde se hicieron crecer durante 2-4 semanas. Las puntas de las raíces que emergían de las hojas de *Nicotiana tabacum* o *Daucus carota* se trataron de una manera similar. Para cada clon, se verificó directamente un fragmento de raíz para determinar la expresión de GFP mediante la observación de la emisión de

fluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse 90i. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon Sight DS-5MC. Para cada especie, los 10 clones más brillantes se cultivaron adicionalmente en medio líquido.

5 Para iniciar los cultivos en medio líquido, se transfirieron a continuación 5 piezas (aproximadamente 1 cm de longitud) de cada clon de raíz pilosa a un tubo de vidrio que contenía 5 ml de medio líquido B53cef que consistía en medio B5 (Duchefa) de pH 5,8 con un suplemento de sacarosa al 3% y 300 de mg/l de cefotaxima sódica y se cultivaron durante 10 días. Las raíces pilosas se cultivaron a continuación sucesivamente (cada vez durante 3 semanas) en un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contenía 20 ml de B53cef y en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de B53cef. Después de esas etapas destinadas a deshacerse de la *Agrobacteria* mediante el uso del antibiótico cefotaxima, las condiciones de cultivo convencionales fueron las siguientes: 100 ml de medio B5 con un suplemento de sacarosa al 3%, pH 5,8 a 20-25°C bajo luz tenue, en un aparato giratorio Gerhardt RO20 (90 rpm/min). Los clones de raíz se subcultivaron cada 3 semanas con 1 g de biomasa de raíces por 100 ml de medio de cultivo.

Las raíces pilosas de *Daucus carota* se cultivaron en medio MW (Bécard *et al.*, 1988) en lugar del medio B5.

C. Cuantificación de 6XHis-eGFP mediante fluorometría

15 Para la cuantificación de 6XHis-eGFP secretada, se añadieron 50 µl de Tris/HCl 1 M, pH 8 a alícuotas de 500 µl del medio de cultivo de raíz. La fluorescencia de 6XHis-eGFP se midió en un fluorómetro BioRad VersaFluo™ (filtro de excitación: 485-495 nm; filtro de emisión: 505-515 nm). La calibración del fluorómetro se realizó utilizando 6XHis-eGFP recombinante asequible comercialmente (BioVision) a una concentración de 1 a 10 mg/L.

20 Para la cuantificación de 6XHis-eGFP intracelular, el tejido de la raíz se trituró en nitrógeno líquido y se homogeneizó una alícuota del polvo de tejido obtenido (equivalente a una punta de espátula) en 500 µl de Tris/HCl 10 mM pH 8 enfriado con hielo, y se centrifugó a 4°C durante 5 min a 14.000 g. La cuantificación de la proteína total del sobrenadante se llevó a cabo utilizando el método de Bradford y la muestra se diluyó con Tris/HCl 10 mM de pH 8 hasta alcanzar una concentración total de proteínas de 50 mg/L. La muestra diluida se utilizó directamente para las mediciones de fluorescencia. La curva patrón se realizó utilizando 6XHis-eGFP recombinante asequible comercialmente (BioVision) diluida en extracto de raíz pilosa de tipo salvaje con una concentración total de proteínas de 50 mg/L.

D. SDS-PAGE y transferencia Western

30 Se tomaron muestras de alícuotas de medio de cultivo de raíces pilosas en los momentos indicados, se mezclaron con 1/3 del volumen de 3X tampón Laemmli y se hirvieron durante 5 min. Se cargaron 40 µl de cada muestra en acrilamida para SDS-PAGE al 12,5% y el gel se tiñó con azul Coomassie. Se utilizó 6XHis-eGFP expresada en *E. coli* (Biovisión) asequible comercialmente como control cuantitativo y cualitativo.

Se llevaron a cabo transferencias Western sobre membranas de nitrocelulosa (Protean) utilizando el sistema de transferencia de BioRad de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

II. Resultados

35 A. Nivel de producción de 6XHis-eGFP intracelular en *Nicotiana tabacum* (NT) y en las dos especies

Brassica rapa (VER) y *Daucus carota* (TOU)

1. Observación microscópica de fluorescencia de 6XHis-eGFP

40 Se llevó a cabo la observación microscópica de las plantas transformadas con pRD400-GFP, y las plantas de control no transformadas, bajo luz blanca o azul. La luz azul permitió la observación de la fluorescencia verde 6XHis-eGFP en las tres especies transformadas.

2. Cuantificación 6XHis-eGFP intracelular mediante fluorometría

45 Los clones de raíces pilosas transgénicas VER y Nt mostraron una tasa similar de producción 6XHis-eGFP intracelular durante la fase de crecimiento (~ los primeros 30 días). Después ~ 40 días de cultivo, las raíces pilosas de Nt mostraron un color parduzco característico de tejidos moribundos y dejaron de producir la proteína recombinante. En contraste, las raíces de VER mostraron un color de blanco a ligeramente amarillento y no solo continuaron produciendo 6XHis-eGFP sino que también aumentaron su tasa de producción (Figura 2).

50 De este modo, el envejecimiento de la raíz se corresponde con el aumento de la producción 6XHis-eGFP para la especie VER. Esto se confirmó mediante el análisis de las diferentes partes de la biomasa de las raíces cultivadas (Figura 3), que está compuesta por la zona central (zona 1: tejido de la raíz más antiguo), una intermedia (zona 2), y la parte periférica que consiste en tejidos de raíz muy jóvenes y en proliferación (zona 3).

B. 6XHis-eGFP es secretada eficazmente por la especie *Brassica rapa* (VER)

La acumulación de 6XHis-eGFP secretada en el medio de cultivo de cultivos de raíces pilosas de *Brassica rapa* (VER) y *Nicotiana tabacum* (Nt) se controló a lo largo del tiempo mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie. El alto nivel de secreción de 6XHis-eGFP por la especie RVE permite la observación directa de la proteína recombinante en el gel de acrilamida teñido con Coomassie como se muestra en la Figura 4 (panel A). Si bien la 6XHis-eGFP secretada es detectada en el medio de cultivo de raíces de VER directamente desde el 10^o día, la proteína recombinante es indetectable en el medio de cultivo de raíz de Nt.

La emisión de fluorescencia de los medios de cultivo de los que se han tomado muestras (Figura 4, panel B) se corresponde con la presencia de la proteína 6XHis-eGFP de 26 kDa detectada en el gel teñido con Coomassie y confirma su acumulación para el cultivo de raíces de VER a lo largo de los primeros 51 días, alcanzando una concentración de 40 mg/L. Tanto la SDS-PAGE como el análisis fluorométrico revelaron la notable estabilidad de 6XHis-eGFP en el medio de cultivo de raíces de VER. En contraste, la concentración 6XHis-eGFP en el medio de cultivo de Nt alcanzó un máximo de 1 mg/l después de 40 días, y se redujo drásticamente a partir de entonces. Este resultado está de acuerdo con trabajos previos (Medina-Bolivar *et al.*, 2004) que muestran la acumulación de eGFP en el medio de cultivo de raíces de Nt a 0,8 mg/L después de 21 días.

C. *Brassica rapa* (VER) está por delante de diversas especies de plantas por su capacidad para secretar 6XHis-eGFP

Con el fin de determinar si la acumulación a un alto nivel de 6XHis-eGFP es una especificidad de VER, se generaron raíces pilosas transgénicas que expresaban 6XHis-eGFP para otras diversas especies de plantas. Los autores de la presente invención analizaron en primer lugar mediante transferencia western la producción y secreción de 6XHis-eGFP por cultivos de raíces de TOU en comparación con el clon de VER caracterizado previamente (Figura 5).

Los resultados muestran que aunque la especie TOU produjo cantidades similares de 6XHis-eGFP intracelular, la proteína recombinante fue indetectable en el medio de cultivo en contraste con el cultivo de raíces de VER. Se pudo detectar 6XHis-eGFP para ambas especies de plantas en el extracto total de proteína soluble intracelular como se muestra por la revelación de una banda principal a aproximadamente 30 kDa, el tamaño esperado para 6XHis-eGFP. Por otra parte, la 6XHis-eGFP expresada en bacterias migra a la misma posición. También se reveló en estos extractos totales una banda minoritaria que probablemente representa un producto de degradación. La presencia de 6XHis-eGFP secretada se pudo detectar claramente en el medio de cultivo de raíces transgénicas de VER después de 10 días de cultivo, pero no para los cultivos de raíces de TOU, a los 10 ó 21 días de cultivo, lo que indica que, si bien era producida de manera eficaz en las células de TOU, 6XHis-eGFP no fue secretada por las raíces pilosas de esta especie vegetal.

Las mediciones de fluorescencia del medio de cultivo de raíz de *Nicotiana tabacum* (Nt) y tres especies comestibles *Brassica rapa* (Ver), *Spinacia oleracea* (MAT) y *Daucus Carota* (TOU) también confirman que Ver es la especie más eficaz para la secreción de 6XHis-eGFP (Figura 6).

D. 6XHis-eGFP es secretada de manera eficaz por la familia Brassicaceae

Se sometieron a ensayo otras especies que pertenecen a la familia Brassicaceae para determinar la secreción de 6XHis-eGFP.

La 6XHis-eGFP secretada se cuantificó mediante fluorometría en el medio de cultivo de clones independientes de 20 días de edad. El número de identificación de cada clon independiente se indica en el eje de abscisas. *Brassica rapa* (VER), *Raphanus sativus var. niger* (NOI), *Raphanus sativus* (CER) y *Brassica oleracea L. Convar* (QUI) pertenecen a la familia Brassicaceae, mientras *Nicotiana tabacum* (Nt) pertenece a la familia Solanaceae. No se representan en este gráfico son los clones de *Daucus Carota* (TOU) de la familia Apiaceae, que no producen ningún nivel detectable de 6XHis-eGFP secretada.

La secreción más eficaz se observó con los clones derivados de la familia Brassicaceae.

Conclusión

En conclusión, estos estudios demuestran que es posible obtener una buena producción y secreción en el medio extracelular de proteínas heterólogas a partir de raíces pilosas obtenidas de plantas transformantes pertenecientes a la familia Brassicaceae.

Referencias

- Becard G, F. J. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* , pp. 211-218.
- Bulgakov VP. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology advances*, pp. 318-324.
- 5 Daniell H, S. N. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* , pp. 669-679.
- Medina-Bolívar F, C. C. (2004). Production of recombinant proteins by hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors. *Methods Mol Biol.* , pp. 351-63.
- Scmülling, T., Schell, J., & Spena, A. (1988). Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO*, pp. 2621-2629.
- 10 William R Swindell, M. H. (2007). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, p. 125.
- Woods RR, G. B. (2008). Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase. *BMC Biotechnol.*

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université de Picardie Jules Vernes

<120> Método para la producción de proteínas recombinantes a partir de raíces pilosas de plantas

<130> BEP100292

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 13583

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> pRD400-GFP

<400> 1

```

ccgggctggt tgcctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag      60
aaacgccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gcggccgccg gcgttgtgga tacctcgcgg      120
aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg gccgactcac      180
ccggcgcggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg gccggcgacg tggagctggc      240
cagcctcgca aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttcccacag atgatgtgga      300
caagcctggg gataagtgcc ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact actgacagat      360
gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtgtctga cagatgaggg gcgcacctat      420
tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat ttgcaagggt ttccgcccgt      480
ttttcgcca ccgtaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt ataaaccttg      540
tttttaacca gggctgcgcc ctgtgcgctg gaccgcgcac gccgaagggg ggtgcccccc      600
cttctcgaac cctcccggcc cgtaacgcg ggcctcccat cccccaggg gctgcgcccc      660
tcggccgca acggcctcac ccaaaaaatg gcagcgcctg cagtccttgc cattgccggg      720
atcggggcag taacgggatg ggcgatcagc ccgagcgcga cgcccgaag cattgacgtg      780
ccgcaggtgc tggcatcgac attcagcgac caggtgccgg gcagtgaggg cggcggcctg      840
ggtggcggcc tgccttcac ttcggccgtc ggggcattca cggacttcat ggcggggccg      900
gcaattttta ccttgggcat tcttggcata gtggtcgcgg gtgccgtgct cgtgttcggg      960
ggtgcgataa acccagcgaa ccatttgagg tgataggtaa gattataacc aggtatgaaa     1020
acgagaattg gacctttaca gaattactct atgaagcgcc atatttaaaa agctaccaag     1080
acgaagagga tgaagaggat gaggaggcag attgccttga atatattgac aatactgata     1140
agataatata tcttttatat agaagatata gccgtatgta aggatttcag gggcaaggc     1200
ataggcagcg cgcttatcaa tatatctata gaatgggcaa agcataaaaa cttgcatgga     1260
ctaagtcttg aaaccagga caataacctt atagcttcta aattctatca taattgggta     1320
atgactcaa cttattgata gtgttttatg ttcagataat gcccgatgac tttgtcatgc     1380
agctccaccg attttgagaa cgacagcgac ttccgtccca gccgtgccag gtgtgcctc     1440

```

15

ES 2 461 941 T3

agattcaggt tatgccgctc aattcgctgc gtatatcgct tgctgattac gtgcagcttt 1500
 cccttcaggc gggattcata cagcggccag ccatccgtca tccatatcac cacgtcaaag 1560
 ggtgacagca ggctcataag acgccccagc gtcgccatag tgcgttcacc gaatacgtgc 1620
 gcaacaaccg tcttccggag actgtcatac gcgtaaaaca gccagcgctg gcgcgattta 1680
 gccccgacat agccccactg ttcgtccatt tccgcgcaga cgatgacgtc actgcccggc 1740
 tgatgctcgc aggttaccga ctgctgctgc agttttttaa gtgacgtaaa atcgtgttga 1800
 ggccaacgcc cataatgctg gctgttggcc ggcatccaac gccattcatg gccatatcaa 1860
 tgattttctg gtgctgaccg ggttgagaag cgggtgaagt gaactgcagt tgccatgttt 1920
 tacggcagtg agagcagaga tagcgtgat gtccggcggg gcttttgccg ttacgcacca 1980
 ccccgctcag agctgaacag gagggacagc tgatagacac agaagccact ggagcacctc 2040
 aaaaacacca tcatacacta aatcagtaag ttggcagcat caccataat tgtggtttca 2100
 aatcggctc cgctgatact atgttatcgc ccaactttga aaacaacttt gaaaaagctg 2160
 ttttctggta ttttaagttt tagaatgcaa ggaacagtga attggagttc gtcttgttat 2220
 aattagcttc ttggggatc tttaaatact gtagaaaaga ggaaggaaat aataaatggc 2280
 taaaatgaga atatcaccgg aattgaaaaa actgatcgaa aaataccgct gcgtaaaaga 2340
 tacggaagga atgtctcctg ctaaggtata taagctggtg ggagaaaatg aaaacctata 2400
 tttaaaaatg acggacagcc ggtataaagg gaccacctat gatgtggaac gggaaaagga 2460
 catgatgcta tggctggaag gaaagctgcc tgttccaaag gtcctgcact ttgaacggca 2520
 tgatggctgg agcaatctgc tcatgagtga ggccgatggc gtcctttgct cggaagagta 2580
 tgaagatgaa caaagccctg aaaagattat cgagctgtat gcggagtgca tcaggctctt 2640
 tcaactccatc gacatatcgg attgtcccta tacgaatagc ttagacagcc gcttagccga 2700
 attggattac ttactgaata acgatctggc cgatgtggat tgcgaaaact gggagaaga 2760
 cactccattt aaagatccgc gcgagctgta tgatttttta aagacggaaa agcccgaaga 2820
 ggaacttgtc ttttcccacg gcgacctggg agacagcaac atctttgtga aagatggcaa 2880
 agtaagtggc tttatgatc ttgggagaag cggcagggcg gacaagtggg atgacattgc 2940
 cttctgcgtc cggctgatca gggaggatat cggggaagaa cagtatgtcg agctatttt 3000
 tgacttactg gggatcaagc ctgattggga gaaaataaaa tattatattt tactggatga 3060
 attgttttag tacctagatg tggcgcaacg atgccggcga caagcaggag cgcaccgact 3120
 tcttccgat caagtgtttt ggctctcagg ccgaggcca cggcaagtat ttgggcaagg 3180
 ggtcgtggt attcgtgcag ggcaagattc ggaataccaa gtacgagaag gacggccaga 3240
 cggcttacgg gaccgacttc attgccgata aggtggatta tctggacacc aaggcaccag 3300
 gcgggtcaaa tcaggaataa gggcacattg ccccgcgctg agtcggggca atcccgaag 3360
 gagggatgaat gaatcggacg tttgaccgga aggcatacag gcaagaactg atcgacgctg 3420
 ggttttccgc cgaggatgcc gaaaccatcg caagccgcac cgtcatgctg gcgccccgcg 3480

ES 2 461 941 T3

aaaccttcca gtcgctcggc tcgatgggcc agcaagctac ggccaagatc gagcgcgaca 3540
 gcgtgcaact ggctccccct gccctgcccg cgccatcggc cgccgtggag cgttcgcgtc 3600
 gtctcgaaca ggaggcggca ggtttgccga agtcgatgac catcgacacg cgaggaacta 3660
 tgacgaccaa gaagcgaaaa accgccggcg aggacctggc aaaacaggtc agcgaggcca 3720
 agcaggccgc gttgctgaaa cacacgaagc agcagatcaa ggaaatgcag ctttccttgt 3780
 tcgatattgc gccgtggccc gacacgatgc gagcgatgcc aaacgacacg gcccgcctctg 3840
 ccctgttcac cacgcgcaac aagaaaatcc cgcgcgaggc gctgcaaac aaggctcattt 3900
 tccacgtcaa caaggacgtg aagatcacct acaccggcgt cgagctgcgg gccgacgatg 3960
 acgaactggt gtggcagcag gtggttgagt acgcgaagcg caccctatc ggcgagccga 4020
 tcaccttac gttctacgag ctttgccagg acctgggctg gtcgatcaat ggccggtatt 4080
 acacgaaggc cgaggaatgc ctgtcgcgcc tacaggcgac ggcgatgggc ttcacgtccg 4140
 accgcgttg gacacctgaa tcggtgtcgc tgctgcaccg cttccgcgtc ctggaccgtg 4200
 gcaagaaac gtcccgttg caggtcctga tcgacgagga aatcgtcgtg ctgtttgctg 4260
 gcgaccacta cacgaaatc atatgggaga agtaccgcaa gctgtcggc acggcccgc 4320
 ggatgttcga ctatttcagc tcgcaccggg agccgtacc ctcgaagctg gaaaccttc 4380
 gcctcatgtg cggatcggat tccacccgcg tgaagaagt gcgcgagcag gtcggcgaag 4440
 cctgcgaaga gttgcgaggc agcggcctgg tggaacacgc ctgggtcaat gatgacctg 4500
 tgcatgcaa acgctagggc cttgtggggc cagttccggc tgggggttca gcagccagcg 4560
 ctttactggc atttcaggaa caagcgggca ctgctcgac cacttgctt gctcagtatc 4620
 gctcgggacg cacggcgcgc tctacgaact gccgataaac agaggattaa aattgacaat 4680
 tgtgattaag gctcagattc gacggccttg agcggccgac gtgcaggatt tccgcgagat 4740
 ccgattgtcg gccctgaaga aagctccaga gatgttcggg tccgtttacg agcacgagga 4800
 gaaaaagccc atggaggcgt tcgctgaacg gttgcgagat gccgtggcat tcggcgccta 4860
 catcgacggc gagatcattg ggctgtcgtt cttcaaacag gaggacggcc ccaaggacgc 4920
 tcacaaggcg catctgtccc gcgttttctg ggagcccga cagcgaggcc gaggggtcgc 4980
 cggtatgctg ctgcggcgtg tgccggcggg tttattgctc gtgatgatcg tccgacagat 5040
 tccaacggga atctggtgga tgcgcatctt catcctcggc gcacttaata tttcgtatt 5100
 ctggagcttg ttgtttattt cggctaccg cctgccggc ggggtcgcgg cgacggtagg 5160
 cgctgtgacg ccgctgatgg tcgtgttcat ctctgccgct ctgctaggta gcccgatacg 5220
 attgatggcg gtcctggggg ctatttgcgg aactgcgggc gtggcgctgt tgggtgtgac 5280
 accaaacgca gcgctagatc ctgtcggcgt cgcagcgggc ctggcggggg cggtttccat 5340
 ggcgttcggg accgtgctga cccgcaagt gcaacctccc gtgcctctgc tcacctttac 5400
 cgctggcaa ctggcggccc gaggacttct gctcgttcca gtagctttag tgtttgatcc 5460
 gccaatcccg atgcctacag gaaccaatgt tctcggcctg gcgtggctcg gcctgatcgg 5520

ES 2 461 941 T3

agcgggttta acctacttcc tttggttccg ggggatctcg cgactcgaac ctacagttgt 5580
 ttccttactg ggcttttca gccccagatc tggggtcgat cagccgggga tgcacagggc 5640
 cgacagtcgg aacttcgggt cccccagctg taccattcgg tgagcaatgg ataggggagt 5700
 tgatatcgtc aacgttcaact tctaaagaaa tagcgccact cagcttcctc agcggcttta 5760
 tccagcgatt tcctattatg tcggcatagt tctcaagatc gacagcctgt cacggttaag 5820
 cgagaaatga ataagaaggc tgataattcg gatctctgcg agggagatga ttttgatca 5880
 caggcagcaa cgctctgtca tcgttacaat caacatgcta ccctccgca gatcatccgt 5940
 gtttcaaacc cggcagctta gttgccgttc ttccgaatag catcggtaac atgagcaaa 6000
 tctgccgcct tacaacggct ctcccgtga cgccgtccc gactgatggg ctgcctgtat 6060
 cgagtgggga tttgtgccg agctgccggg cggggagctg ttggctggct ggtggcagga 6120
 tatattgtgg tgtaaacaaa ttgacgctta gacaacttaa taacacattg cggacgtttt 6180
 taatgtactg ggggtggttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc 6240
 accgcctggc cctgagagag ttgacgcaag cgggccacgc tggtttgccc cagcaggcga 6300
 aaatcctggt tgatgggtgt tccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaatagc 6360
 ccgagatagg gttgagtggt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 6420
 actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacat 6480
 cacccaaatc aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 6540
 ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaagga 6600
 agaaagcgaaggagcgggc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg 6660
 cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt 6720
 tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattcgag 6780
 ctcggtacc ctaactcaaaa aatgtcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg 6840
 agacttttca acaagggta atttcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagtatct 6900
 gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg 6960
 ataaaggaaa ggctatcatt caagatgcct ctgccgacag tggtcctaaa gatggacccc 7020
 caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg 7080
 attgatgtga catctccact gacgtaaggg atgacgcaca atccccccc tactccaaaa 7140
 atgtcaaaga tacagtctca gaagaccaa gggctattga gacttttcaa caaagggtaa 7200
 tttcgggaaa cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcatc gaaaggacag 7260
 tagaaaagga aggtggctcc tacaatgcc atcattgca taaaggaaag gctatcattc 7320
 aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccagagg agcatcgtgg 7380
 aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgac atctccactg 7440
 acgtaaggga tgacgcacaa tccactatc cttcgcaaga cccttctct atataaggaa 7500
 gttcatttca tttggagagg acagcccaag cttaaaacaa caatgggata cacaaatgtg 7560

ES 2 461 941 T3

tccattttat taggcctggt gatggtcttt gttacaccga tgggtttcgc agatcccatg 7620
 catcatcatc atcaccaccc catggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg 7680
 cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag 7740
 ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac caccggcaag 7800
 ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc 7860
 cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgcatgcc cgaaggctac 7920
 gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg 7980
 aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag 8040
 gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatac 8100
 atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca caacatcgag 8160
 gacggcagcg tgagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc 8220
 gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtccg ccctgagcaa agacccaac 8280
 gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc 8340
 atggacgagc tgtacaagta aagcggccgc gactctagaa ttcgctgaaa tcaccagtct 8400
 ctctctacaa atctatctct ctctatcttc tccataaata atgtgtgagt agtttcccgga 8460
 taagggaaat tagggttctt atagggtttc gctcatgtgt tgagcatata agaaaccctt 8520
 agtatgtatt tgtatctgta aaatacttct atcaataaaa tttctaattc ctaaaaccaa 8580
 aatccagtac taaaaaccag atcctctaga gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggcgta 8640
 atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat 8700
 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt 8760
 aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgctgtgcc agctgcatta 8820
 atgaatcggc caacgcgagg ggagagggcg tttgctatt gggccaaaga caaaagggcg 8880
 acattcaacc gattgagggg ggggaaggtaa atattgacgg aaattattca ttaaaggtga 8940
 attatcaccg tcaccgactt gagccatttg ggaattagag ccagcaaat caccagtagc 9000
 accattacca ttagcaaggc cggaaacgtc accaatgaaa ccatcgatag cagcaccgta 9060
 atcagtagcg acagaatcaa gtttgccttt agcgtcagac ttagcgcgt tttcatcggc 9120
 attttcggtc atagcccctt tattagcgtt tgccatcttt tcataatcaa aatcaccgga 9180
 accagagcca ccaccggaac cgctccctc agagccgcca ccctcagaac cgccaccctc 9240
 agagccacca ccctcagagc cgccaccaga accaccacca gagccgccgc cagcattgac 9300
 aggaggcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgca taatttatcc tagtttgcgc 9360
 gctatatttt gttttctatc gcgtatataa tgtataattg cgggactcta atcataaaaa 9420
 cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat tacatgctta acgtaattca 9480
 acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt 9540
 attgccaaat gtttgaacga tcggggatca tccgggtctg tggcgggaac tccacgaaaa 9600

ES 2 461 941 T3

tatccgaacg cagcaagata tcgcggtgca tctcggctctt gcctgggcag tcgccgccga 9660
 cgccgttgat gtggacgccg ggcccgatca tattgtcgct caggatcgtg gcgttgtgct 9720
 tgtcggccgt tgctgtcgta atgatatcgg caccttcgac cgcctgttcc gcagagatcc 9780
 cgtgggcgaa gaactccagc atgagatccc cgcgctggag gatcatccag ccggcgtccc 9840
 ggaaaacgat tccgaagccc aacctttcat agaaggcggc ggtggaatcg aaatctcgtg 9900
 atggcagggtt gggcgtcgct tggcgggtca tttcgaaccc cagagtcccg ctcagaagaa 9960
 ctcgtcaaga äggcgataga äggcgatgcg ctgcaatcg ggagcggcga taccgtaaag 10020
 cacgaggaag cggtcagccc attcggccgc aagctcttca gcaatatcac gggtagccaa 10080
 cgctatgtcc tgatagcggc ccgccacacc cagccggcca cagtcatga atccagaaaa 10140
 gcggccattt tccaccatga tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc 10200
 ctcgccgtcg ggcatgcbg ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg 10260
 atgctcttcg tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg 10320
 ctcgatgca tgtttcgtt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa gcgatgagc 10380
 ccgccgatt gcacagcca tgatggatac tttctcggca ggagcaaggc gagatgacag 10440
 gagatctgc cccggcactt cgcccaatag cagccagtc cttcccgtt cagtgaaca 10500
 gtcgagcaca gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc 10560
 gtcctgcagt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc 10620
 ctgcbgtgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgcccagtc 10680
 atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgctc 10740
 aatcatgca aacgatccag atccggtgca gattatcttg attgagagtg aatatgagac 10800
 tctaattgga taccgagggg aatttatgga acgtcagtg agcatttttg acaagaata 10860
 tttgctagct gatagtgacc ttaggcgact tttgaacgcb caataatggt ttctgacgta 10920
 tgtgcttagc tcattaaact ccagaaaccc gcggctgagt ggctccttca acgttgcbgt 10980
 tctgtcagtt ccaaacgtaa aacggcttgt cccgcbtcat cggcgggggt cataacgtga 11040
 ctccctaat tctccgctca tgatcagatt gtcgtttccc gccttcagtt taaactatca 11100
 gtgcttgaca ggatatattg gcgggtaaac ctaagagaaa agagcgttta ttagaataat 11160
 cggatattta aaaggcgtg aaaaggctta tccgttcgct catttgatg tgcatgccaa 11220
 ccacagggtt ccccagatct ggcgccggcc agcagacga gcaagattg ccgccgccg 11280
 aaacgatccg acagcgcgcb cagcacaggt gcgcbggca attgcaccaa cgcatacagc 11340
 gccagcagaa tgccatagtg ggcggtgacg tcgttcgagt gaaccagatc gcgcbggagg 11400
 cccggcagca ccggcataat caggccgatg ccgacagcgt cbgcbggcb acgtgctcaga 11460
 attacgatca ggggtatggt gggtttcacg tctggcctcc ggaccagcct ccgctggtcc 11520
 gattgaacgc gcggattctt tctactgat aagttggtgg acatattatg tttatcagtg 11580
 ataaagtgtc aagcatgaca aagttgcagc cgaatacagt gatccgtgcc gccctggacc 11640

ES 2 461 941 T3

tgttgaacga ggtcggcgta gacggtctga cgacacgcaa actggcggaa cggttggggg 11700
 ttcagcagcc ggcgctttac tggcacttca ggaacaagcg ggcgctgctc gacgcactgg 11760
 ccgaagccat gctggcggag aatcatacgc attcggtgcc gagagccgac gacgactggc 11820
 gctcatttct gatcgggaat gcccgagct tcaggcaggc gctgctcgcc taccgcatg 11880
 gcgcgcgcat ccatgccggc acgcgaccgg gcgcaccgca gatggaaacg gccgacgcg 11940
 agcttcgctt cctctgcgag gcgggttttt cggccgggga cgccgtcaat gcgctgatga 12000
 caatcagcta cttcactggt ggggccgtgc ttgaggagca ggccggcgac agcgatgccg 12060
 gcgagcgcgg cggcaccggt gaacaggctc cgctctcgcc gctggtgagg gccgcatag 12120
 acgccttcga cgaagccggt ccggacgcag cgttcgagca gggactcgcg gtgattgtcg 12180
 atggattggc gaaaaggagg ctcggtgtca ggaacgttga aggaccgaga aagggtgacg 12240
 attgatcagg accgctgccg gagcgcaacc cactcactac agcagagcca ttagacaac 12300
 atccccccc ctttccacc gcgtcagacg cccgtagcag cccgctacgg gctttttcat 12360
 gccctgccct agcgtccaag cctcacggcc gcgctcgcc tctctggcg cttctggcg 12420
 ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg 12480
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 12540
 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttctggc 12600
 gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 12660
 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gtcctctcgt 12720
 gcgctctcct gttccgacct tgcgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg 12780
 aagcgtggcg ctttccgct gcataaccct gcttcggggt cattatagcg atttttcgg 12840
 tatatccatc ctttttcgca cgatatacag gattttgcca aagggttcgt gtagactttc 12900
 cttggtgat ccaacggcgt cagccgggca ggataggtga agtaggcca cccgagcgcg 12960
 ggtgttcctt cttcactgct ccttattcgc acctggcggg gctcaacggg aatcctgctc 13020
 tgcgaggctg gccggctacc gccggcgtaa cagatgagg caagcggatg gctgatgaaa 13080
 ccaagccaac caggaagggc agcccaccta tcaaggtgta ctgccttcca gacgaacgaa 13140
 gagcgattga ggaaaaggcg gcggcgccg gcatgagcct gtcggcctac ctgctggccg 13200
 tcggccaggg ctacaaaatc acgggcgctg tggactatga gcacgtccgc gagctggccc 13260
 gcatcaatgg cgacctggc gcctggggc gcctgctgaa actctggctc accgacgacc 13320
 gcgcacggc gcggttcggt gatgccagca tcctcgccct gctggcgaag atcgaagaga 13380
 agcaggacga gcttgcaag gtcgatgagg gcgtggtccg cccgagggca gagccatgac 13440
 ttttttagcc gctaaaacgg ccggggggtg gcggtgattg ccaagcacgt ccccatgctc 13500
 tccatcaaga agagcgactt cgcggagctg gtgaagtaca tcaccgacga gcaaggcaag 13560
 accgagcggc tttgcgacgc tca 13583

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

5

<400> 2

Met Gly Tyr Thr Asn Val Ser Ile Leu Leu Gly Leu Leu Met Val Phe
 1 5 10 15

Val Thr Pro Met Val Phe Ala Asp Pro
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para secretar una proteína recombinante a partir de raíces pilosas que comprende las etapas de:
- 5 a) transformar una planta con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* y/o con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende los genes *rol*;
- y
- b) transformar dicha planta con un vector que contiene una casete de expresión que comprende un péptido señal y un gen que codifica dicha proteína recombinante;
- en donde dicha planta pertenece a la familia Brassicaceae.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa a) y la etapa b) se realizan simultáneamente mediante la transformación de dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae con una cepa de *Agrobacterium rhizogenes*, en donde dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* contiene una casete de expresión que comprende un gen que codifica dicha proteína recombinante.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae se selecciona del grupo que consiste en *Raphanus sativus*, *Raphanus sativus* var. *niger*, *Brassica oleracea* L. convar y *Brassica rapa*.
- 15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha planta perteneciente a la familia Brassicaceae es *Brassica rapa*.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha cepa de *Agrobacterium rhizogenes* es la cepa ATCC 25818.
- 20 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha casete de expresión comprende un promotor, un péptido señal, un gen que codifica dicha proteína recombinante y una secuencia de poliadenilación.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho promotor es un promotor derivado de un virus que infecta plantas Brassicaceae.
- 25 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho promotor es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S).
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicho péptido señal deriva de una planta de Brassicaceae.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho péptido señal es un péptido señal del péptido señal AT1G69940 de la pectina metilesterasa de *Arabidopsis* o una variante del mismo, tal como el péptido señal mostrado en el SEQ ID NO: 1.
- 30 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en alérgenos, vacunas, enzimas, inhibidores de enzimas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, antígenos, toxinas, péptidos antimicrobianos, hormonas, factores de crecimiento, proteínas de la sangre (tales como albúmina, factores de coagulación, transferrina), proteínas receptoras y de señalización, componentes proteicos de patrones biomédicos, componente proteicos de medios de cultivo celulares, proteínas de fusión o etiquetadas, péptidos y proteínas ricos en cisteína (puentes disulfuro), y proteínas vegetales (tales como lectinas, papaína..).
- 35

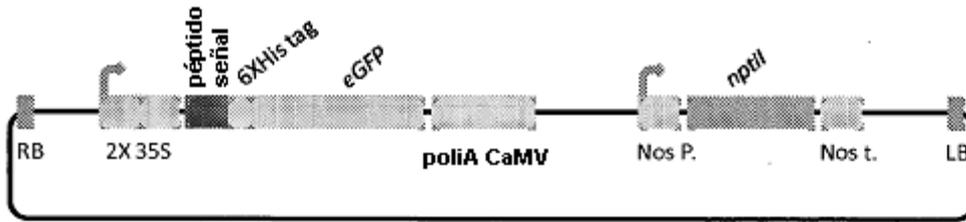


Figura 1

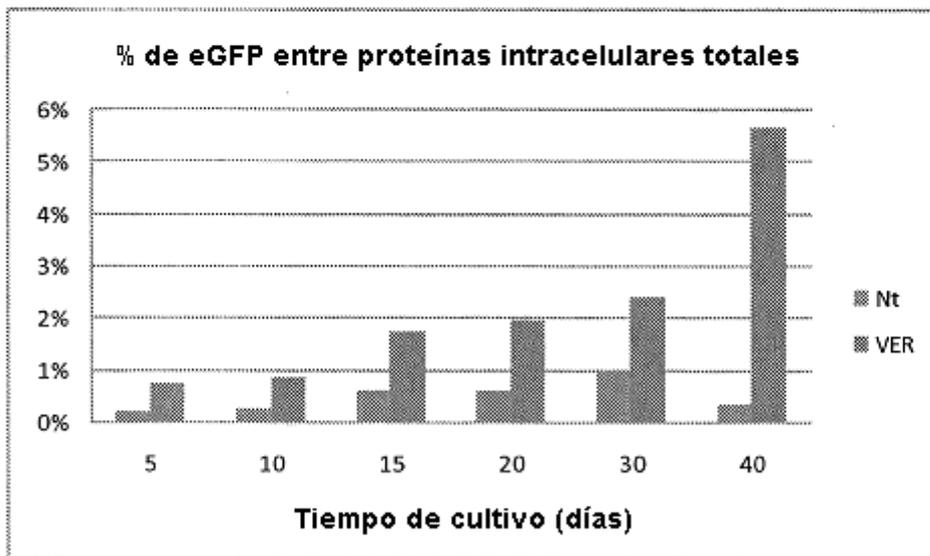


Figura 2

Biomasa de raíz cultivada

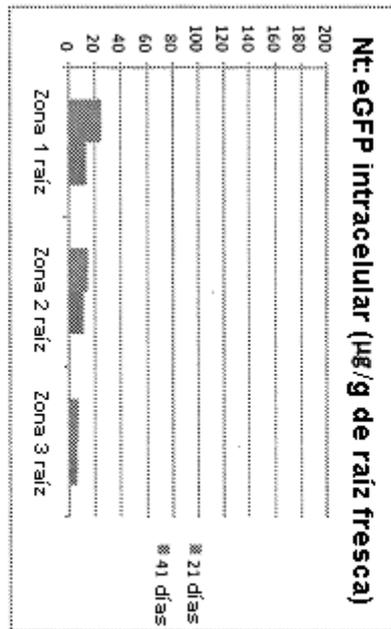
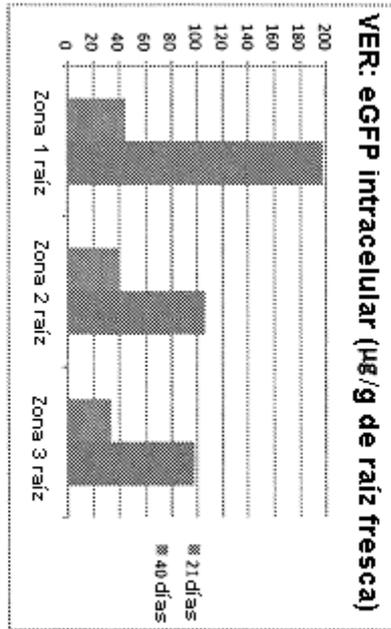
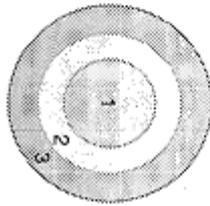


Figura 3

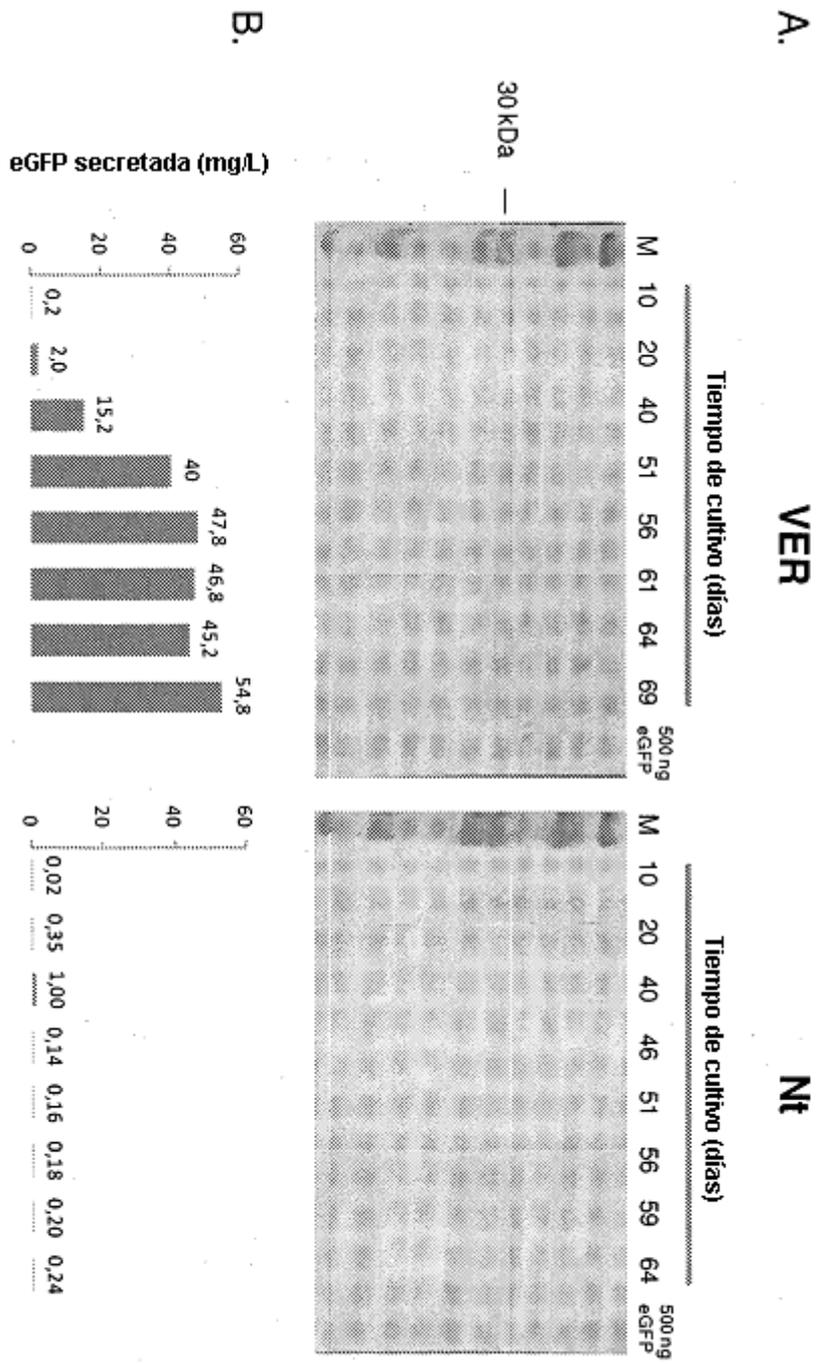


Figura 4

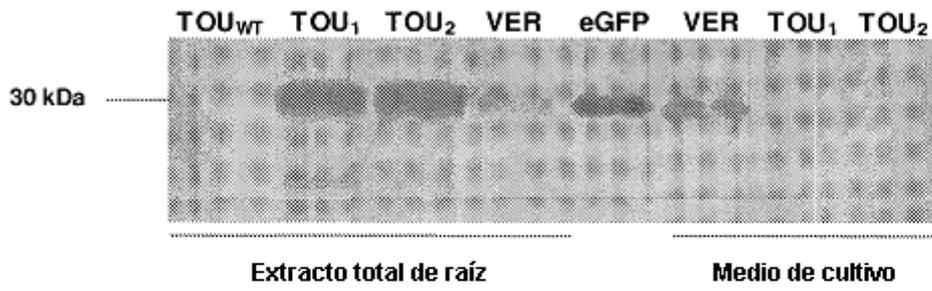


Figura 5

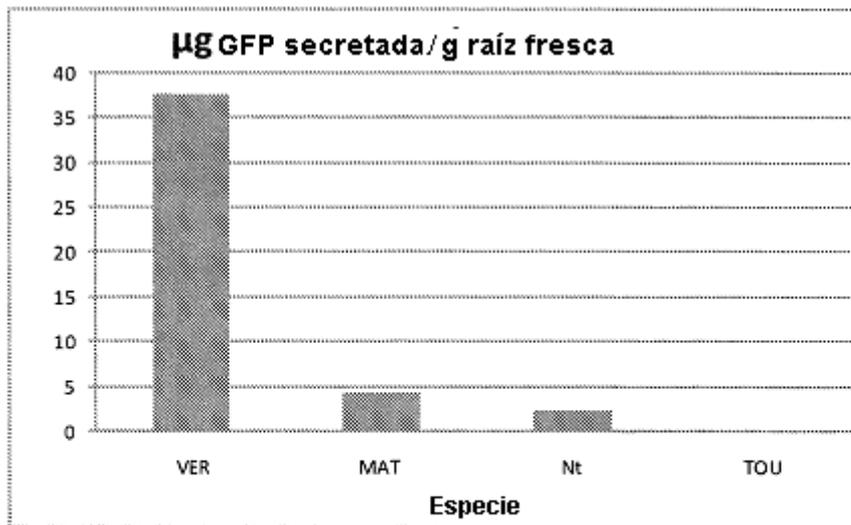


Figura 6

µg de eGFP secretada / g de raíz fresca

Elevado nivel de eGFP secretada en cultivos de raíz transgénica de la familia Brassicaceae

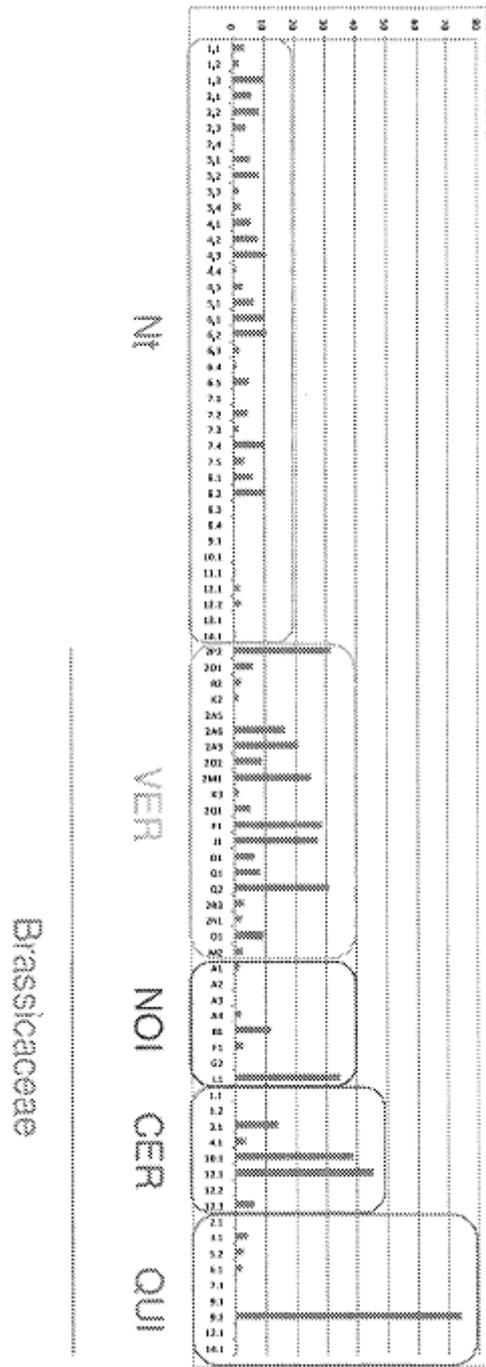


Figura 7