

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 973**

51 Int. Cl.:

C12N 1/13 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09771189 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2294179**

54 Título: **Inducción de la floculación en organismos fotosintéticos**

30 Prioridad:

27.06.2008 US 76430 P

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

11.07.2014

73 Titular/es:

**SAPPHIRE ENERGY, INC. (100.0%)
Attn: Legal Department 3115 Merryfield Row
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**MENDEZ, MICHAEL;
BEHNKE, CRAIG;
POON, YAN y
LEE, PHILIP**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 475 973 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

Inducción de la floculación en organismos fotosintéticos.

5 **Técnica anterior**

Las algas son organismos unicelulares que producen oxígeno por fotosíntesis. Un grupo de algas, las microalgas, son útiles en aplicaciones biotecnológicas por muchas razones, entre ellas su elevada tasa de proliferación y su tolerancia a diversas condiciones ambientales. Se conoce y/o se ha sugerido la utilización de microalgas en diversos procesos industriales para productos de importancia comercial. Por ejemplo, las microalgas se aplican en la producción de complementos alimenticios, productos farmacéuticos, colorantes naturales, fuentes de alimento para peces y crustáceos, en el control biológico de plagas agrícolas, la producción de oxígeno y la eliminación de nitrógeno, fósforo y sustancias tóxicas en el tratamiento de aguas residuales y controles de contaminación, tales como la biodegradación de los plásticos o la absorción de dióxido de carbono.

Las microalgas, al igual que otros organismos, contienen lípidos y ácidos grasos como componentes de membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. Se ha descubierto que algunas cepas de algas, diatomeas y cianobacterias contienen, proporcionalmente, niveles elevados de lípidos (más del 30%). Las cepas de microalgas con un elevado contenido de aceites o lípidos tienen un gran interés en la búsqueda de una materia prima sostenible para la producción de biocombustibles.

Algunas algas de tipo natural son adecuadas para su utilización en diversas aplicaciones industriales. Sin embargo, se conoce que, mediante la modificación de las algas para mejorar determinadas características útiles para las aplicaciones anteriormente mencionadas, es más probable que los procesos implicados sean comercialmente viables. Con este fin, se pueden desarrollar cepas de algas con características mejoradas con respecto a las cepas de tipo natural. Esto se ha llevado a cabo mediante técnicas tradicionales de cribado y de mutación y selección. Además, se han propuesto ampliamente tecnologías de ADN recombinante. Estos enfoques pueden aumentar la viabilidad económica de la producción de productos de valor comercial.

Para la producción de algunos productos comerciales de interés se pueden cultivar los organismos productores de los productos en medios líquidos. A veces resulta beneficioso eliminar los organismos de dichos medios líquidos. Un método de eliminación de los organismos consiste en flocularlos o agregarlos para facilitar su eliminación. Los floculantes o agentes floculantes potencian la floculación, provocando la agregación de los coloides y otras partículas en suspensión (por ejemplo, las células) presentes en los líquidos, formando de este modo un flóculo. Los floculantes se utilizan en los procesos de tratamiento de aguas para mejorar la sedimentación de las partículas pequeñas. Por ejemplo, se puede utilizar un floculante en la filtración de agua de piscina o de agua potable a fin de facilitar la eliminación de las partículas microscópicas que, de otro modo, provocarían que el agua fuera turbia y serían difíciles de eliminar únicamente por filtración.

Muchos floculantes son cationes multivalentes, tales como aluminio, hierro, calcio o magnesio. Estas moléculas de carga positiva interactúan con las partículas y moléculas de carga negativa y reducen las barreras a la agregación. Además, muchas de estas sustancias químicas, a un pH adecuado y en otras condiciones adecuadas, tales como de temperatura y salinidad, reaccionan con el agua y forman hidróxidos insolubles que, al precipitar, se unen y dan lugar a largas cadenas o mallas, atrapando físicamente las partículas pequeñas en dicho flóculo de gran tamaño.

Se conoce la floculación de microalgas mediante la utilización de floculantes químicos. Las empresas que se dedican a la producción de floculantes fabrican y comercializan floculantes poliméricos de cadena larga, tales como poliácridamidas modificadas. Éstos se pueden presentar en forma seca o líquida para su utilización en el proceso de floculación. La poliácridamida líquida más común, por ejemplo, se suministra en forma de emulsión con un 10-40% de ingredientes activos, y el resto es líquido portador, tensioactivos y látex.

Sin embargo, la utilización de floculantes químicos tiene diversas desventajas. Por ejemplo, su utilización en el tratamiento de aguas *et al* procesos exige la eliminación posterior de los floculantes. La adición y la eliminación de los floculantes agrava los costes de la producción comercial del producto de interés, disminuyendo de este modo la viabilidad económica de la producción.

Sumario

Un aspecto de la presente memoria da a conocer vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica una fracción de floculación y un elemento regulador unido para expresar la fracción de floculación en el núcleo de un organismo fotosintético. Las fracciones de floculación que se utilizan en la presente invención pueden comprender proteínas de unión a hidratos de carbono, anticuerpos que se unen a un antígeno de superficie celular de *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta* o *H. pluvialis*, lectina, proteína FhuA, proteína pb5 u otras proteínas que forman un fuerte emparejamiento proteína-proteína que provoca la floculación de las microalgas. Los elementos reguladores que se utilizan en los vectores pueden comprender un promotor constitutivo, un promotor inducible mediante luz, un promotor sensible al quórum, un promotor sensible a la temperatura o un promotor sensible a la deficiencia de

5 nitrógeno. Los vectores que se dan a conocer en el presente documento también pueden contener ácidos nucleicos capaces de dirigir la fracción de floculación hacia la superficie celular y anclar una parte de la fracción de floculación, de modo que se mantenga fuertemente unida sobre la superficie celular. Los vectores se utilizan para transformar organismos fotosintéticos no vasculares, tales como las microalgas, para su floculación. En determinados casos, la fracción de anclaje puede ser opcional, ya que la secreción de la fracción de floculación en el cultivo, dependiendo de la propiedad de la fracción de floculación, es el método preferible para la floculación.

10 Otro aspecto da a conocer procedimientos de floculación que utilizan organismos fotosintéticos no vasculares. Entre los ejemplos de organismos fotosintéticos no vasculares se incluyen *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. Los métodos de floculación pueden comprender la creación de dos organismos fotosintéticos claramente diferentes mediante la transformación con diferentes fracciones de floculación y la provocación de la floculación al permitir que las dos fracciones de floculación interactúen entre sí. Entre los ejemplos de fracciones de floculación se incluyen la interacción proteína-proteína entre FhuA y pb5, las interacciones entre aglutininas específicas del tipo de apareamiento, un emparejamiento anticuerpo-antígeno y otras proteínas capaces de reconocerse entre sí como pareja y formar un complejo proteína-proteína estable. Entre los ejemplos de métodos para la inducción de la floculación de los organismos fotosintéticos no vasculares se encuentran la variación de las condiciones de luz, la densidad del cultivo, la temperatura del cultivo o la disponibilidad de los nutrientes; la adición de lectina, proteínas, metales pesados, floculantes catiónicos o químicos al cultivo; o la fijación de los agentes de floculación mencionados anteriormente a un soporte sólido.

20 Otro aspecto da a conocer procedimientos para reciclar el líquido de cultivo de un medio líquido. Los organismos fotosintéticos no vasculares se pueden cultivar en medios con medios definidos conocidos en la técnica, tales como medio M min-70 o medio TAP. Con frecuencia, tras la floculación es posible y económicamente beneficioso reciclar la parte líquida del cultivo. En la presente memoria se dan a conocer procedimientos para permitir el reciclaje del líquido, entre los cuales se incluye el cultivo de microorganismos que codifican una fracción de floculación; poner en contacto el organismo con una fracción de floculación y, de este modo, flocular el organismo; y la eliminación del microorganismo agregado del medio líquido.

30 Un aspecto particular da a conocer un procedimiento de floculación de un organismo fotosintético no vascular, que comprende expresar un ácido nucleico exógeno que codifica una primera fracción de floculación en la superficie exterior de un organismo fotosintético no vascular y poner en contacto dicho organismo con una segunda fracción de floculación. El organismo puede ser un miembro de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, por ejemplo, *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*, aunque se pueden utilizar miembros de otros géneros. La primera fracción de floculación puede ser una proteína de unión a hidratos de carbono, tal como una lectina, y en particular una lectina de tipo C. Otros ejemplos no limitantes de proteínas de unión a hidratos de carbono son DC-SIGN, dectina-1, dectina-2, HECL, langerina, laylina, mincle, MMGL, E-selectina, P-selectina, L-selectina, DEC-205, Endo 180, receptor de manosa, receptor de fosfolipasa A2, sialoadhesina (siglec-1), siglec-2, siglec-3, siglec-4, siglec-5, siglec-6, siglec-7, siglec-8, siglec-9, siglec-10, siglec-11 y galectinas. En otras formas de realización, la primera fracción de floculación puede ser un anticuerpo univalente, multivalente o polivalente, por ejemplo un anticuerpo scFv, que se une a un antígeno de la superficie de un organismo de interés. Entre los ejemplos de dichos organismos se incluyen miembros de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, tal como *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. Algunas formas de realización pueden incluir además la utilización de una segunda fracción de floculación. La segunda fracción de floculación puede encontrarse en la superficie de un soporte sólido o en la superficie de un segundo organismo, que puede ser o no un organismo fotosintético no vascular. Cuando la segunda fracción de floculación se expresa en la superficie de un segundo organismo, la segunda fracción de floculación puede ser de origen natural o puede ser el resultado de la expresión de una secuencia de nucleótidos exógena. En algunas formas de realización, el primer y el segundo organismos son de la misma especie, mientras que en otras, el primero y el segundo organismos son de cepas diferentes, géneros diferentes o reinos diferentes. Por ejemplo, en una forma de realización, el primer y el segundo organismos son algas, mientras que, en otra forma de realización, un organismo es un alga y el otro es una bacteria o una levadura. Cuando la segunda fracción de floculación se encuentra en la superficie de un segundo organismo o soporte sólido, el procedimiento comprende además la combinación del primer organismo con el segundo organismo, con el soporte sólido o con ambos.

55 Otro aspecto da a conocer un organismo fotosintético no vascular que comprende una proteína exógena en la superficie celular externa del organismo, tal como la membrana celular o pared celular; comprendiendo dicha proteína exógena un miembro de una pareja de unión. La proteína exógena puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo de fragmentos variables monocatenarios (scFv) o una proteína de unión a hidratos de carbono, tal como una lectina, por ejemplo, una lectina de tipo C. En otras formas de realización, la proteína exógena es un antígeno que es la diana de un anticuerpo y, en una forma de realización, un anticuerpo específico para ese antígeno. En algunas formas de realización, la proteína exógena es una proteína de fusión o quimérica en la que parte de la proteína sirve para anclarla a la superficie celular. El organismo fotosintético no vascular puede ser un alga, por ejemplo, un alga verde, más particularmente un miembro de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, y más particularmente uno de entre *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. En una forma de realización, el organismo fotosintético no vascular es un halófilo, tal como *D. salina* o *D. tertiolecta*. En otras formas de realización, la proteína de unión a hidratos de carbono es, como mínimo, una de entre

DC-SIGN, dectina-1, dectina-2, HECL, langerina, layilina, mincle, MMGL, E-selectina, P-selectina, L-selectina, DEC-205, Endo 180, receptor de manosa, receptor de fosfolipasa A2, sialoadhesina (siglec-1), 2, siglec-3, siglec-4, siglec-5, siglec-6, siglec-7, siglec-8, siglec-9, siglec-10, siglec-11 y galectinas.

5 Otro aspecto da a conocer un procedimiento de floculación que comprende la transformación de un primer organismo fotosintético no vascular con un ácido nucleico que codifica una primera fracción de floculación, la transformación de un segundo organismo, que puede ser o no un organismo fotosintético no vascular, con un ácido nucleico que codifica una segunda fracción de floculación o una proteína necesaria para la producción de una
 10 segunda fracción de floculación que interactúa con la primera fracción de floculación, expresándose la primera y la segunda fracciones de floculación y poniéndolas en contacto, de modo que se produzca la floculación. Los dos organismos pueden ser del mismo género o de géneros diferentes, de la misma especie o de especies diferentes, o del mismo reino o de reinos diferentes. Por ejemplo, los organismos pueden ser de la misma especie de alga, de diferentes especies de algas, o un alga y una bacteria o levadura. El primer organismo, el segundo organismo o ambos pueden ser miembros de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, de modo
 15 que uno o ambos organismos pueden ser *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. La primera o la segunda fracciones de floculación pueden ser anticuerpos, proteínas de unión a hidratos de carbono o aglutininas específicas del tipo de apareamiento.

20 Otro aspecto da a conocer un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una fracción de floculación, un elemento regulador para la expresión de la fracción de floculación en el organismo fotosintético, por ejemplo en el núcleo, y un elemento de direccionamiento que permite que la fracción de floculación se dirija a la superficie del organismo o sea secretada por el mismo. La fracción de floculación puede ser un anticuerpo o cualquiera de las proteínas de unión a hidratos de carbono descritas en el presente documento. Entre los ejemplos específicos de fracciones de floculación se incluyen anticuerpos, lectinas, la proteína FhuA y la proteína pb5.
 25 Cuando el ácido nucleico codifica un anticuerpo, puede ser un anticuerpo a un antígeno de la superficie de un miembro de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, por ejemplo, *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. En algunas formas de realización, el vector comprende además un ácido nucleico que codifica un elemento de anclaje que ancla la fracción de floculación a la superficie del organismo.

30 Otro aspecto da a conocer una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores anteriores. La célula hospedadora puede ser o no un organismo fotosintético no vascular. En algunas formas de realización, la célula hospedadora es un miembro de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, por ejemplo *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. En otra forma de realización, la célula hospedadora es una bacteria o una levadura.

35 Otro aspecto da a conocer un procedimiento para el reciclaje de líquido, tal como agua o un medio de cultivo a base de agua, que comprende cultivar un organismo fotosintético no vascular, que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una fracción de floculación en un medio líquido, poner en contacto el organismo con una segunda fracción de floculación que se une directa o indirectamente a la primera fracción de floculación, provocando la
 40 floculación del organismo y separando, como mínimo, una parte del líquido del medio líquido del organismo. La primera y la segunda fracciones de floculación pueden ser cualquiera de las fracciones descritas en el presente documento, entre las cuales se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, anticuerpos, proteínas de unión a hidratos de carbono, hidratos de carbono, floculantes de metales pesados, floculantes químicos, floculantes catiónicos y aglutininas de tipo de apareamiento. La segunda fracción de floculación puede estar unida a la
 45 superficie de un segundo organismo, que puede ser o no un organismo fotosintético no vascular, o puede estar unida a un soporte sólido.

Otro aspecto da a conocer un procedimiento de floculación de un organismo fotosintético no vascular, que comprende poner en contacto dicho organismo fotosintético no vascular con un segundo organismo, que comprende
 50 un ácido nucleico exógeno que codifica un anticuerpo que se une a un antígeno de la superficie del organismo fotosintético no vascular, provocando de este modo su floculación. En una forma de realización, el anticuerpo se expresa en la superficie del segundo organismo. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de fragmentos variables monocatenarios (scFv). En otra forma de realización, el ácido nucleico exógeno codifica una proteína de fusión o química que comprende el anticuerpo y un componente de anclaje que ancla el anticuerpo a la superficie externa de la membrana celular o pared celular del segundo organismo. En una forma de realización, el
 55 segundo organismo es una bacteria, mientras que en otra forma de realización, el segundo organismo es una levadura. El organismo fotosintético no vascular puede ser un alga verde, por ejemplo un miembro de los géneros *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* o *Hematococcus*, y más particularmente *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*.

60 Otro aspecto da a conocer un procedimiento de floculación de un organismo fotosintético no vascular, que comprende poner en contacto dicho organismo fotosintético no vascular con un segundo organismo, que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una fracción de floculación que se une a un componente de superficie de dicho organismo fotosintético no vascular, provocando de este modo la floculación de dicho organismo fotosintético
 65 no vascular. La fracción de floculación puede ser secretada por el segundo organismo, estar expresada en su superficie, o ambos. El segundo organismo puede ser una levadura, una bacteria, un alga no fotosintética o un alga

fotosintética. En algunas formas de realización, el segundo organismo es *E. coli* o *P. pastoris*. La proteína de unión a hidratos de carbono puede ser, como mínimo, un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende DC-SIGN, dectina-1, dectina-2, HECL, langerina, layilina, mincle, MMGL, E-selectina, P-selectina, L-selectina, DEC-205, Endo 180, receptor de manosa, receptor de fosfolipasa A2, sialoadhesina (siglec-1), siglec-2, siglec-3, siglec-4, siglec-5, siglec-6, siglec-7, siglec-8, siglec-9, siglec-10, siglec-11 y galectinas. En algunas formas de realización, la proteína de unión a hidratos de carbono es una lectina, por ejemplo, una lectina de tipo C.

En cualquiera de las formas de realización descritas en la presente memoria, un ácido nucleico exógeno que codifica una fracción de floculación, por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de unión a hidratos de carbono, puede comprender además uno o más elementos reguladores, tales como un promotor. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Entre los promotores inducibles se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, promotores inducibles mediante luz, promotores sensibles al quórum, promotores sensibles a la temperatura o promotores sensibles al nitrógeno.

Debe apreciarse que, a menos que se indique lo contrario, cuando se hace referencia a la expresión o la presencia de una fracción de floculación en la superficie de un organismo o soporte sólido, la misma se refiere a la superficie exterior del organismo o soporte sólido, que es la superficie encarada al entorno en el que está presente el organismo que se pretende flocular.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la presente invención se describen con detalle en las reivindicaciones adjuntas. Se puede tener una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada, que expone formas de realización ilustrativas en las que se utilizan los principios de la presente invención, y a partir de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 ilustra diversos constructos utilizados en la presente descripción.

La figura 2 es un diagrama de flujo de floculación mediante lectina. "Perform Q.C.": llevar a cabo el control de calidad (QC) del cultivo a gran escala, incluyendo la tasa de proliferación, el pH del medio y el cribado para detectar contaminación de la cepa. "N": flujo de trabajo alternativo en caso de condiciones insatisfactorias para avanzar hacia la siguiente etapa.

La figura 3 es un diagrama de flujo de floculación inducida por un anticuerpo anti-Fus1.

La figura 4 es un diagrama de flujo de floculación inducida por la expresión de FhuA y pb5.

La figura 5 es un diagrama de flujo de floculación inducida por genes regulados por deficiencia de nitrógeno en *Chlamydomonas reinhardtii* modificada genéticamente.

La figura 6 muestra la actividad de lectinas recombinantes producidas en *E. coli*. A-D son *Chlamydomonas reinhardtii*, siendo A y C controles negativos y estando B y D en presencia de lectinas conjugadas con FITC de *H. pomatia* y *T. vulgaris*, respectivamente. E-H son *Scenedesmus dimorphus*, siendo E y G controles negativos y estando F y H en presencia de lectinas conjugadas con FITC de *H. pomatia* y *T. vulgaris*, respectivamente.

La figura 7 muestra la inserción de una proteína de fusión de LppOmpA-lectina en la membrana celular de *E. coli*.

La figura 8 muestra el efecto de una proteína de fusión de lectina de *L. culinaris* y β -autotransportador sobre la sedimentación de *S. dimorphus*.

La figura 9 muestra una transferencia Western que indica la correcta inserción de una fusión LppOmpA-scFv5 en la membrana plasmática de *E. coli*.

La figura 10 muestra una transferencia Western de lectinas secretadas en *Pichia pastoris*. Los ejemplos representativos marcados como 1 (lectina de *H. pomatia*) y 2 (lectina de *L. culinaris*) muestran la secreción de proteínas al medio de crecimiento.

La figura 11 muestra la expresión de proteínas de fusión de lectina y supercántigo en *P. pastoris*: (1) Pirlb-lectina de *H. pomatia*, (2) Pir1b-lectina de *L. culinaris* y (3) Pirla-lectina de *T. vulgaris*.

La figura 12 muestra la inserción de una proteína de fusión Pirla-lectina en la membrana de *P. pastoris*.

La figura 13 muestra la expresión de fusiones Fas1-lectina. Banda 1: Fas1-lectina de *L. culinaris*; Banda 2: Fas1-lectina truncada *L. culinaris*; Banda 3: Fas1-lectina de *E. cristagalli*.

La figura 14 muestra una transferencia Western que describe la localización subcelular de proteínas de fusión

Fas1-lectina. WT: 21gr; Control: Enzima citosólica: 1: fusión Fas1-lectina de *L. culinaris*; 2: fusión Fas1-lectina truncada de *L. culinaris*; 3: fusión Fas1-lectina de *E. cristagalli*.

5 La figura 15 muestra el efecto de la presencia del constructo de proteína de fusión Fas1-lectina de *T. vulgaris* en la sedimentación.

La figura 16 muestra la expresión de células enteras de proteínas GP1-lectina en *C. reinhardtii*. 1: fusión GP1-lectina de *H. pomatia*; 2: fusión GP1-lectina truncada de *L. culinaris*.

10 La figura 17 muestra una transferencia Western que describe la localización subcelular de proteínas de fusión GP1-lectina. WT: 21gr; Control: Enzima citosólica; GP1-lectina de *H. pomatia*.

La figura 18 muestra el efecto de la presencia del constructo GP1-lectina de *H. pomatia* en la sedimentación.

15 La figura 19 muestra una transferencia Western que indica la expresión de una proteína de fusión scFv5-Fas1 en *C. reinhardtii*. 1: La proteína de fusión se muestra aquí. La banda superior es la fusión intacta residual con la proteína de bleomicina.

20 La figura 20 muestra una transferencia Western que describe la localización subcelular de proteínas de fusión Fas1. WT: 21gr; Control: Enzima citosólica; fusión scFv5-Fas1. Hay una proteína scFv5-Fas1 que se localiza en la fracción de membrana. (flecha).

25 La figura 21 muestra la expresión inducida por NO₃ de lectina de *H. pomatia* en *C. reinhardtii*. Carril 1: Tiempo 0, TAP; Carril 2: Tiempo 12 horas, TAP; Carril 3: Tiempo 24 horas, TAP; Carril 4: Tiempo 12 horas, TAP - NH₄Cl + KNO₃ 7,4 mM; Carril 5: Tiempo 24 horas, TAP - NH₄Cl + KNO₃ 7,4 mM; Carril 6: Control.

La figura 22 muestra la floculación de dos cepas de *C. reinhardtii* tras someterse a privación de nitrógeno.

30 La figura 23 muestra la floculación de dos cepas de *C. reinhardtii* tras someterse a minimización de nitrógeno.

Descripción detallada

35 La presente memoria da a conocer nuevos enfoques para iniciar la floculación en organismos fotosintéticos, y particularmente en organismos fotosintéticos no vasculares (NVPO). El cultivo de organismos fotosintéticos, particularmente organismos unicelulares como microalgas o cianobacterias, con fines industriales o agrícolas implica a menudo la recolección de las células de los organismos en medios líquidos. Actualmente, gran parte de esta recolección se lleva a cabo por centrifugación, procesamiento en prensa de correa, adición de floculantes químicos al medio líquido, o una combinación de métodos. Los métodos tradicionales de floculación pueden comportar costes adicionales (por ejemplo, el coste del floculante, el de la eliminación del floculante del líquido y/o los organismos, etc.) *et al* problemas (por ejemplo, la contaminación, la purificación del producto, etc.). La presente memoria da a conocer composiciones novedosas, células hospedadoras y métodos para la floculación de organismos fotosintéticos que pueden superar los inconvenientes de las metodologías tradicionales de floculación.

45 La presente memoria aprovecha las fuertes interacciones moleculares entre moléculas diferentes, por ejemplo, anticuerpos y antígenos, proteínas e hidratos de carbono, parejas de unión proteína-proteína, etc. Se pueden utilizar parejas de floculación (dos complejos de componentes) o complejos de floculación (más de dos complejos de componentes). En algunos casos, un miembro de una pareja de floculación o complejo se expresa de forma natural en el organismo que se flocula, pero el nivel de producción se puede aumentar genéticamente. En otros casos, un miembro de una pareja de floculación o complejo se puede expresar de forma recombinante en el organismo que se debe flocular. A continuación, el organismo se pone en contacto con la segunda (y/o subsiguiente) fracción de floculación a fin de inducir la floculación. Las segundas o subsiguientes fracciones de floculación se pueden añadir extrínsecamente (por ejemplo, sobre una fase sólida, tal como una bola o un tamiz), expresarse en un organismo separado (que puede ser de la misma especie que el primer organismo o de especies diferentes) que a continuación se pone en contacto con el primer organismo, o expresarse en el mismo organismo (por ejemplo, bajo el control de un elemento regulador inducible).

55 Uno de los enfoques que se aplican comprende la manipulación genética de un organismo fotosintético (por ejemplo, un NVPO) para expresar una o más fracciones de floculación. La manipulación genética puede comprender la transformación transitoria o integradora de un organismo fotosintético (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus dimorphus*, *Hematococcus pluvialis*) o un organismo no fotosintético (por ejemplo, *E. coli*) con un ácido nucleico que codifica una fracción de floculación. En algunos casos, la fracción de floculación es una proteína capaz de unirse a otra proteína, un hidrato de carbono u otra molécula de interés. Por ejemplo, la *C. reinhardtii* se puede transformar con un gen que codifica una proteína de superficie celular de *C. reinhardtii* fusionada a un anticuerpo, de modo que la expresión del anticuerpo en la superficie de la célula provocará la floculación de las células transformadas o cualquier otro organismo diana. Se han producido anticuerpos en cloroplastos de *C. reinhardtii*, pero esta expresión no produce anticuerpo en la superficie celular.

Véase, por ejemplo, Mayfield *et al*, PNAS 100(2):438-42 (2003). Alternativamente, el anticuerpo se puede expresar en la superficie de un organismo no fotosintético. En una forma de realización, el organismo no fotosintético es un procarionta, tal como una bacteria. En otra forma de realización, el organismo no fotosintético es un eucariota, por ejemplo, un hongo, y más particularmente una levadura. A continuación, los anticuerpos de superficie celular presentes en la superficie del organismo no fotosintético se unen a múltiples organismos fotosintéticos, lo que da lugar a la floculación.

Células hospedadoras

La presente memoria también comprende una célula hospedadora transformada con uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. En algunas formas de realización, la célula hospedadora es fotosintética. En algunos casos, la célula hospedadora es fotosintética y no vascular. En otros casos, la célula hospedadora es fotosintética y vascular. En otros casos, la célula hospedadora es no fotosintética. La célula hospedadora puede ser eucariota o procarionta. Algunas células hospedadoras se pueden transformar con múltiples genes que codifican una o más fracciones de floculación. Por ejemplo, una sola célula transformada puede contener ácidos nucleicos exógenos que codifican uno, dos, tres o más proteínas o subunidades de las mismas. Por ejemplo, un alga como *C. reinhardtii*, una bacteria como *E. coli* o una cianobacteria, o una levadura, como *Pichia pastoris*, se puede transformar con un gen que codifica un anticuerpo que reconoce una proteína de superficie celular del organismo que se debe flocular, produciéndose el anticuerpo como proteína de fusión o como dos o más subunidades que se ensamblan internamente. El organismo que se pretende flocular puede ser el mismo que el organismo que expresa la proteína de superficie u otro diferente. Los constructos pueden contener múltiples copias del mismo gen, y/o múltiples genes que codifican la misma proteína, y/o múltiples genes con mutaciones en una o más partes de las secuencias de codificación.

La célula hospedadora se transfecta con un vector descrito en la presente memoria (por ejemplo, un vector que comprende uno o más genes que codifican fracciones de floculación). El vector puede contener un promotor de plastidios o un promotor nuclear para transformar el núcleo o un cloroplasto u otro plastidio de la célula hospedadora. El vector también puede codificar una proteína de fusión o agente que dirige selectivamente el producto del vector al núcleo o el cloroplasto u otro plastidio. La transfección de una célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica.

Un organismo hospedador es un organismo que comprende una célula hospedadora. En algunas formas de realización, el organismo hospedador es fotosintético. Un organismo fotosintético es un organismo que fotosintetiza de forma natural (tiene un plastidio) o que se modifica por ingeniería genética o de otro modo para que sea fotosintético. En algunos casos, el organismo fotosintético se puede transformar con un constructo que hace que todo o parte del aparato fotosintético sea inoperable. En algunos casos, es no vascular y fotosintético. La célula hospedadora puede ser procarionta. Algunos ejemplos de organismos procariontas fotosintéticos según la presente invención son, aunque no se limitan a los mismos, las cianobacterias (por ejemplo, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Athrospira*). El organismo hospedador puede ser unicelular o pluricelular. En diversas formas de realización, el organismo hospedador es eucariota (por ejemplo, un alga verde). Entre los ejemplos de organismos contemplados en el presente documento se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, rodófitas, clorófitas, heterocontófitas, tribófitas, glaucófitas, cloraracniofitas, euglenoides, haptófitas, criptomonas, dinoflagelados y fitoplancton. En otras formas de realización, el organismo hospedador es no fotosintético. Entre los organismos hospedadores no fotosintéticos se incluyen las bacterias y las levaduras. Se pueden encontrar ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados en el filo proteobacterias y entre ellos se incluye, aunque no se limita a la misma, la *Escherichia coli*. Se pueden encontrar ejemplos de organismos de tipo levadura adecuados en el filo *Ascomycota*, y entre los mismos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Se puede cultivar un organismo hospedador en condiciones que permitan la fotosíntesis, pero no es necesario (por ejemplo, se puede cultivar en ausencia de luz). En algunos casos, el organismo hospedador puede estar modificado genéticamente, de modo que su capacidad fotosintética esté disminuida y/o destruida. En condiciones de cultivo en las que un organismo hospedador no sea capaz de realizar la fotosíntesis (por ejemplo, debido a la ausencia de luz y/o por una modificación genética), generalmente se proporcionan al organismo los nutrientes necesarios para su crecimiento en ausencia de fotosíntesis. Por ejemplo, un medio de cultivo en el cual (o sobre el cual) se cultiva un organismo se puede complementar con cualquier nutriente necesario, incluidas una fuente orgánica de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas, metales, lípidos, ácidos nucleicos, micronutrientes o un requisito específico del organismo. Entre las fuentes orgánicas de carbono se incluye cualquier fuente de carbono que el organismo hospedador sea capaz de metabolizar, entre las cuales, aunque sin limitarse a las mismas, acetato, hidratos de carbono simples (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa), hidratos de carbono complejos (por ejemplo, almidón, glucógeno), proteínas y lípidos. El experto en la materia sabe que no todos los organismos son capaces de metabolizar suficientemente un determinado nutriente, y que las mezclas de nutrientes pueden tenerse que modificar de un organismo a otro con el fin de proporcionar la mezcla de nutrientes adecuada.

El organismo hospedador se puede cultivar en tierra, por ejemplo en estanques, acueductos o vertederos, o en sistemas biorreactores cerrados o parcialmente cerrados. Los organismos hospedadores también se pueden cultivar directamente en agua, por ejemplo, en océanos, mares, lagos, ríos, embalses, etc. En las formas de realización en

las que se cultivan algas en masa, éstas se pueden cultivar en fotobiorreactores de alta densidad. En la técnica se conocen métodos de cultivo de algas en masa. Por ejemplo, se pueden cultivar en fotobiorreactores de alta densidad (véase, por ejemplo, Lee *et al*, Biotech. Bioengineering 44:1161-1167, 1994) *et al* biorreactores (como los utilizados en el tratamiento de aguas de desecho y residuales) (por ejemplo, Sawayama *et al*, Appl. Micro. Biotech., 41:729-731, 1994). Además, se pueden cultivar algas en masa para eliminar metales pesados (por ejemplo, Wilkinson, Biotech. Letters, 11:861-864, 1989), hidrógeno (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20030162273) y compuestos farmacéuticos.

Un grupo ilustrativo de organismos son las algas verdes. Un ejemplo, las *Chlamydomonas*, son un género de algas verdes unicelulares (*Chlorophyta*). Estas algas se encuentran en el suelo, en aguas frescas, océanos, e incluso en la nieve de las cumbres. La algas de este género presentan una pared celular, un cloroplasto y dos flagelos anteriores que le dan movilidad en entornos líquidos. Se han descrito más de 500 especies diferentes de *Chlamydomonas*.

La especie más utilizada en laboratorios es la *C. reinhardtii*. Las células de esta especie son haploides y pueden crecer en un medio sencillo de sales inorgánicas, utilizando la fotosíntesis para obtener energía. También pueden crecer en la oscuridad total si se proporciona acetato como fuente de carbono. Cuando se las priva de nitrógeno, las células de *C. reinhardtii* pueden diferenciarse en isogametos. Existen dos tipos de apareamiento, llamados mt+ y mt-. Éstos se fusionan sexualmente, generando un cigoto de pared gruesa que forma una pared exterior dura que lo protege de las diversas condiciones del entorno. La expresión controlada de aglutininas de tipo de apareamiento se puede utilizar para facilitar la floculación. Cuando se vuelve a colocar en un medio de cultivo con nitrógeno y en presencia de luz y agua, la cigospora diploide sufre meiosis y libera cuatro células haploides que retoman el ciclo de vida vegetativa. En el crecimiento mitótico, las células se duplican cada ocho horas. Las células de *C. reinhardtii* pueden crecer en una amplia gama de condiciones. Aunque un espacio protegido y con control de la temperatura puede dar lugar a un crecimiento óptimo, la *C. reinhardtii* se puede cultivar fácilmente a temperatura ambiente bajo luces fluorescentes estándar. Las células se pueden sincronizar sometiéndolas a un ciclo de luz y oscuridad y privándolas de acetato.

La genética nuclear de la *C. reinhardtii* se conoce bien. Se han caracterizado un gran número de mutantes y el centro de investigación de la *C. reinhardtii* (www.chlamy.org) mantiene una extensa colección de mutantes y de secuencias genómicas anotadas de la especie *Chlamydomonas*. Se han desarrollado un gran número de mutantes de cloroplastos, así como varios mutantes mitocondriales, en la *C. reinhardtii*.

En la presente memoria, el término "vegetal" se utiliza en sentido amplio para referirse a un organismo eucariota que contiene plastidios, particularmente cloroplastos, e incluye cualquier organismo en cualquier etapa de desarrollo, o para referirse a parte de un vegetal, incluido un corte del mismo, a un cultivo de células vegetales, a un órgano vegetal, a una semilla vegetal o a una plántula. Una célula vegetal es la unidad estructural y fisiológica del vegetal, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula vegetal se puede encontrar en forma de célula aislada o de célula cultivada, o puede formar parte de una unidad superior organizada, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta. Por consiguiente, una célula vegetal puede ser un protoplasto, una célula productora de gametos o una célula o colección de células que pueden regenerarse en una planta entera. Como tal, una semilla, que comprende múltiples células vegetales y es capaz de regenerarse en una planta entera, se considera célula vegetal a efectos de la presente descripción. Un tejido vegetal u órgano vegetal puede ser una semilla, un protoplasto, un callo o cualquier otro grupo de células vegetales organizado en una unidad estructural o funcional. Entre las partes particularmente útiles de un vegetal se incluyen las partes cosechables y las partes útiles para la propagación de las plantas de la progenie. Una parte cosechable de un vegetal puede ser cualquier parte útil de un vegetal, por ejemplo las flores, el polen, las plántulas, los tubérculos, las hojas, los tallos, los frutos, las semillas, las raíces y similares. Entre las partes de un vegetal útiles para la propagación se incluyen, por ejemplo, las semillas, los frutos, los esquejes, las plántulas, los tubérculos, los rizomas y similares.

Vectores

Los vectores descritos en la presente memoria pueden ser capaces de provocar la transformación estable de múltiples organismos fotosintéticos, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, bacterias fotosintéticas (incluidas las cianobacterias), cianófitas, proclorófitas, rodófitas, clorófitas, heterocontófitas, tribófitos, glaucófitas, clorarcniofitas, euglenófitas, euglenoides, haptófitas, crisófitas, criptófitas, criptomonas, dinófitas, dinoflagelados, pirmnesiofitas, bacilariófitas, xantófitas, eustigmatófitas, rafidófitas, algas pardas y fitoplancton. Otros vectores son capaces de provocar una transformación estable de *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta*, *S. dimorphus* o *H. pluvialis*. Otros vectores son capaces de provocar una transformación estable de organismos no fotosintéticos, tales como levaduras y bacterias. Los vectores para la transformación estable de las bacterias y levaduras son bien conocidos en la técnica y se pueden obtener a través de proveedores comerciales. Se pueden modificar vectores de expresión por ingeniería genética a fin de producir la proteína o proteínas heterólogas y/o homólogas de interés (por ejemplo, anticuerpos, aglutininas de tipo de apareamiento, etc.). Dichos vectores son útiles para producir de forma recombinante la proteína de interés. Dichos vectores también son útiles para modificar el fenotipo natural de las células hospedadoras (por ejemplo, expresando una fracción de floculación).

Se puede construir un casete de expresión en un vector apropiado. En algunos casos, el casete se diseña de modo

que exprese una o más secuencias de codificación proteínica en una célula hospedadora. Dichos vectores pueden construirse utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. En un casete de expresión típico, el promotor o elemento regulador está situado en el lado 5' o secuencia arriba de una secuencia codificante cuya expresión se desea. En otros casetes, una secuencia de codificación puede estar flanqueada por secuencias que permiten la expresión tras la inserción en un genoma diana (por ejemplo, nuclear o plastidio). Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una fracción de floculación se puede insertar en un genoma nuclear de una célula hospedadora, de modo que la expresión de la fracción de floculación está controlada por un elemento regulador de origen natural. En la presente memoria, se puede utilizar cualquier elemento regulador que proporcione expresión en condiciones apropiadas, de modo que el ARNm o producto proteínico se expresen en un nivel suficiente para producir la floculación del NVPO transformado.

Una o más secuencias de codificación de proteínas adicionales se pueden fusionar operativamente aguas abajo o 3' de un promotor. Se pueden utilizar secuencias codificantes para proteínas individuales, así como secuencias codificantes para fusiones de dos o más proteínas. Las secuencias codificantes también pueden contener elementos adicionales que permitan que las proteínas expresadas se puedan dirigir a la superficie celular y anclarse a la superficie celular o ser secretadas al medio. También se utiliza un marcador seleccionable en el diseño del vector para una selección eficaz de las algas verdes transformadas por el vector. Un marcador seleccionable y otra secuencia que se desee introducir se pueden introducir fusionados a un promotor simple y secuencia abajo del mismo. Alternativamente, se pueden introducir dos secuencias de codificación de proteínas, cada una bajo el control de un promotor.

Tal como se utiliza el término en la presente memoria, un elemento regulador se refiere, en términos generales, a una secuencia de nucleótidos que regula la transcripción o la traducción de un polinucleótido, o la localización de un polipéptido al que está operativamente unido. Un elemento regulador puede ser nativo o foráneo a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Entre dichos elementos se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, un sitio de unión del ribosoma (RBS), una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción, un promotor, una codón de iniciación (start), una señal de corte y empalme para la escisión del intrón y el mantenimiento de un marco de lectura correcto, un codón de parada stop, un codón ámbar u ocre y/o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Típicamente, un elemento regulador incluye un promotor y señales de parada de la transcripción y la traducción. Los elementos se pueden dotar de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. En algunos casos, dichos vectores incluyen promotores, y adicionalmente, una señal de compartimentación celular (es decir, una secuencia que dirige un polipéptido al citosol, el núcleo, la membrana del cloroplasto o la membrana celular). Dichas señales son bien conocidas en la técnica y han sido ampliamente documentadas (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.776.689). Los promotores útiles para la presente invención pueden provenir de cualquier fuente (por ejemplo, vírica, bacteriana, fúngica, protística, animal). Los promotores considerados en el presente documento pueden ser específicos para organismos fotosintéticos, organismos fotosintéticos no vasculares, organismos fotosintéticos vasculares (por ejemplo, algas, vegetales de floración), levaduras y bacterias. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "organismo fotosintético no vascular" se refiere a cualquier organismo macroscópico o microscópico, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas, que no tienen un sistema vascular como el que se encuentra en las plantas superiores. En algunos casos, los ácidos nucleicos anteriores se insertan en un vector que comprende un promotor de un organismo fotosintético, por ejemplo, de algas. Dicho promotor puede ser un promotor para la expresión en el núcleo o en un cloroplasto y/u otro plastidio. Entre los ejemplos de promotores considerados para la inserción con cualquiera de los ácidos nucleicos del presente documento en el cloroplasto se incluyen los descritos en la solicitud de patente US 2004/0014174. Entre los promotores adecuados para su utilización en bacterias se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, promotores del virus del simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), la repetición terminal larga del VIH (LTR), el virus de Moloney, el ALV, el citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un promotor incluye típicamente las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de transcripción (por ejemplo, un elemento TATA).

Para construir el vector, las secuencias de ADN secuencia arriba de un gen expresado bajo el control de un promotor adecuado puede mapearse por restricción y caracterizarse las zonas importantes para la expresión de la proteína. Se determina la ubicación exacta del codón de inicio del gen y, aprovechando esta información y el mapa de restricción, se puede diseñar un vector para la expresión de una proteína heteróloga mediante la eliminación de la región responsable de codificar la proteína del gen, pero dejando la región superior en el sentido de la secuencia que contiene el material genético responsable del control de la expresión del gen. Preferentemente, se inserta un oligonucleótido sintético se inserta en la ubicación en la que estaba la secuencia de la proteína, de tal manera que podría clonarse cualquier gen adicional utilizando sitios de endonucleasas de restricción en el oligonucleótido sintético (es decir, un sitio de clonación múltiple). A continuación, un gen no relacionado (o secuencia de codificación) que se inserta en este sitio estaría bajo el control de un codón de inicio existente y la región reguladora secuencia arriba que dirige la expresión de la proteína foránea (es decir, normalmente no presente) codificada por este gen. Una vez que el gen que codifica la proteína foránea se introduce en un vector de clonación, se puede introducir en el organismo hospedador utilizando cualquiera de varios métodos, algunos particulares del organismo

hospedador. Las variaciones de estos métodos se describen en la bibliografía general. La manipulación de las condiciones para optimizar la transformación en un determinado hospedador entra dentro de las capacidades del experto en la materia.

5 Con respecto al tipo de plásmido utilizado para la inserción de los diversos casetes de expresión de ADN, se puede utilizar cualquier plásmido adecuado. Los plásmidos o vectores pueden incluir vectores tales como pUC o sus derivados, pBR322, pBluescript o pGEM. Pueden utilizarse otros vectores, entre ellos pPIC3.5K, pPIC9K y pAO815, disponibles a través de Invitrogen (Carlsbad, California, EE. UU.). Se escoge un determinado plásmido en función de la naturaleza de los marcadores, la disponibilidad de sitios de restricción adecuados, el número de copias y similares. La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés puede ser sintética, derivada de forma natural o cualquier combinación de las mismas. Según la naturaleza de la secuencia de ADN de interés, puede ser deseable sintetizar la secuencia con codones preferidos en el NVPO. La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés puede ser un gen estructural o una parte del mismo que proporcione un producto de expresión deseado. El gen puede ser cualquier gen, ya sea nativo, mutante del nativo o foráneo para el hospedador. El término foráneo pretende indicar un gen no endógeno a la célula hospedadora, pero puede incluir secuencias nativas, tales como secuencias víricas y secuencias bacterianas asociadas naturalmente con el NVPO.

El vector utilizado también puede contener una o más secuencias de nucleótidos adicionales que confieran características deseables al vector, entre ellas, por ejemplo, secuencias tales como sitios de clonación que facilitan la manipulación del vector, elementos reguladores que dirigen la replicación del vector o la transcripción de las secuencias de nucleótidos contenidas en él, secuencias que codifican un marcador seleccionable y similares. Como tal, el vector puede contener, por ejemplo, uno o más sitios de clonación, tales como sitios de clonación múltiple, que pueden estar situados, aunque no necesariamente, de tal modo que se puede insertar un polinucleótido heterólogo en el vector y unirse de forma operativa a un elemento deseado. El vector también puede contener un origen de replicación procariota (Ori), por ejemplo, un Ori de *E. coli* o un Ori cósmido, permitiendo así el paso del vector en una célula hospedadora procariota, así como en un cloroplasto vegetal, según se desee. Estas características, combinadas con los marcadores seleccionables adecuados, permiten que el vector sea "transportado" entre la célula hospedadora diana y la célula bacteriana y/o de levadura. La capacidad de hacer pasar un vector lanzadera en un hospedador secundario puede permitir una mayor manipulación de las características del vector. Por ejemplo, una mezcla de reacción que contiene el vector y los polinucleótidos insertados putativos de interés puede transformarse en células hospedadoras procariotas, tales como *E. coli*, amplificarse y recolectarse mediante métodos de rutina, y examinarse para identificar vectores que contienen un inserto o constructo de interés. Si se desea, el vector se puede manipular adicionalmente, por ejemplo, llevando a cabo mutagénesis dirigida al sitio del polinucleótido insertado, luego amplificando de nuevo y seleccionando los vectores con un polinucleótido mutado de interés. A continuación, se puede introducir un vector lanzadera en los cloroplastos de las células vegetales, en las que un polipéptido de interés se puede expresar y, si se desea, aislar.

Un vector u otra molécula de ácido nucleico recombinante puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido indicador u otro marcador seleccionable. El término "marcador seleccionable" se refiere a un polinucleótido (o polipéptido codificado) que confiere un fenotipo detectable. Generalmente, un indicador codifica un polipéptido detectable, por ejemplo, una proteína verde fluorescente o una enzima como la luciferasa, que, cuando entra en contacto con un agente apropiado (una determinada longitud de onda de luz o luciferina, respectivamente) genera una señal que se puede detectar a simple vista o mediante instrumentos apropiados (Giacomin, *Plant Sci.* 116:59-72, 1996; Scikantha, *J. Bacteriol.* 178:121, 1996; Gerdes, *FEBS Lett.* 389:44-47, 1996; véase también Jefferson, *EMBOJ.* 6:3901-3907, 1997, β -glucuronidase). Generalmente, un marcador seleccionable es una molécula que, cuando está presente o se expresa en una célula, proporciona una ventaja (o desventaja) selectiva a la célula que contiene el marcador, por ejemplo, la capacidad de crecer en presencia de un agente que, de otro modo, provocaría la muerte de la célula.

Un marcador seleccionable puede proporcionar un medio para obtener células procariotas o células vegetales, o ambas, que expresan el marcador y, por consiguiente, pueden ser útiles como componentes de un vector (véase, por ejemplo, Bock, *supra*, 2001). Entre los ejemplos de marcadores seleccionables se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, los que proporcionan resistencia a antimetabolitos, por ejemplo, la dihidrofolato reductasa, que proporciona resistencia al metotrexato (Reiss, *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)* 13:143-149, 1994); la neomicina fosfotransferasa, que proporciona resistencia a los aminoglucósidos neomicina, kanamicina y paromicina (Herrera-Estrella, *EMBO J.* 2:987-995, 1983), higró, que proporciona resistencia a higromicina (Marsh, *Gene* 32:481-485, 1984), trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:8047, 1988); isomerasa de manosa-6-fosfato, que permite que las células utilicen manosa (WO 94/20627); ornitina descarboxilasa, que proporciona resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-D,L-ornitina (DFMO; McConlogue, 1987, en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.); y desaminasa de *Aspergillus terreus*, que proporciona resistencia a blasticidina S (Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:2336-2338, 1995). Entre los marcadores seleccionables adicionales se incluyen los que proporcionan resistencia a herbicidas, por ejemplo, el gen de la fosfinotricina acetiltransferasa, que proporciona resistencia a la fosfinotricina (White *et al*, *Nucl. Acids Res.* 18:1062, 1990; Spencer *et al*, *Theor. Appl. Genet.* 79:625-631, 1990), una EPSPV sintasa mutante, que proporciona resistencia al glifosato (Hinchee *et al*, *Biotechnology* 91:915-922, 1998), una acetolactato sintasa mutante, que

proporciona resistencia a imidazolinona o sulfonilurea (Lee *et al*, EMBO J. 7:1241-1248, 1988), un psbA mutante, que proporciona resistencia a la atrazina (Smeda *et al*, Plant Physiol. 103:911-917, 1993), o una protoporfirinógeno oxidasa mutante (véase la patente US nº 5,767,373), u otros marcadores que proporcionan resistencia a un herbicida, tal como el glufosinato. Entre los marcadores seleccionables se incluyen polinucleótidos que proporcionan resistencia a la dihidrofolato reductasa (DHFR) o a la neomicina para células eucariotas y tetraciclina; resistencia a la ampicilina para procariontes como *E. coli*; y resistencia a bleomicina, gentamicina, glifosato, higromicina, kanamicina, metotrexato, fleomicina, fosfotricina, espectinomina, estreptomina, sulfonamida y sulfonilurea en vegetales (véase, por ejemplo, Maliga *et al*, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995, página 39).

Uno o más codones de un polinucleótido de codificación pueden estar sesgados para reflejar el uso de codones preferente de la célula hospedadora o un orgánulo de la misma (por ejemplo, los cloroplastos). La mayoría de los aminoácidos están codificados por dos o más codones (degenerados) diferentes, y es bien conocido que diversos organismos utilizan determinados codones con preferencia a otros. Se ha documentado el sesgo de codones de la *C. reinhardtii* (Véase la solicitud de patente US2004/0014174) así como en bacterias y levaduras (véase, por ejemplo, Gene 18:199-209 (1982); FEBS Lett., 285:165-169 (1991); J. Biol. Chem., 257:3026-3031 (1982)).

El término "sesgado", cuando se utiliza haciendo referencia a un codón, significa que la secuencia de un codón en un polinucleótido se ha modificado de tal manera que dicho codón es un codón que se utiliza con preferencia en la diana para la que se ha obtenido el sesgo, por ejemplo, células de alga, cloroplastos, bacterias o levaduras. Un polinucleótido que está sesgado para un determinado uso de codones se puede sintetizar de novo o puede modificarse genéticamente mediante técnicas de ADN recombinante rutinarias, por ejemplo, por un método de mutagénesis dirigida al sitio, a fin de modificar uno o más codones, de modo que están sesgados para el uso de codones en cloroplastos. El sesgo de codones puede presentar variedad entre vegetales diferentes, incluido, por ejemplo, en algas en comparación con el tabaco. Habitualmente, el sesgo de codones seleccionado refleja el uso de codones del vegetal (o sus orgánulo) que se está transformando con los ácidos nucleicos de la presente invención. Por ejemplo, si la *C. reinhardtii* es el hospedador, el uso de codones en el cloroplasto puede estar sesgado a fin de reflejar el uso de codones nuclear o del cloroplasto (por ejemplo, aproximadamente un 74,6% de sesgo AT en la tercera posición del codón para secuencias dirigidas al cloroplasto). Alternativamente, cuando se utilizan bacterias o levaduras como organismo hospedador, el uso de codones puede estar sesgado para esos organismos.

En la presente invención se dan a conocer vectores utilizados en varios métodos de floculación. Estos vectores o plásmidos pueden comprender elementos reguladores, que son reconocidos por la maquinaria de transcripción génica del organismo hospedador utilizado, incluso para genes nucleares o de plastidios, que codifican secuencias unidas operativamente a los elementos reguladores, marcadores de selección que permiten la selección de células hospedadoras transformadas por el vector *et al* elementos que permiten que el vector se integre de forma estable en el genoma nuclear o plastidio de un organismo hospedador. Entre los ejemplos de elementos reguladores se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, promotores constitutivos, promotores inducibles mediante luz, promotores sensibles al quórum, promotores sensibles a la temperatura o promotores sensibles a la deficiencia de nitrógeno. Un ejemplo de promotor inducible mediante luz se describe en la patente US nº 6.858.429. Entre los ejemplos de fracciones de floculación que pueden estar codificadas por los polinucleótidos utilizados en la presente memoria se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, FhuA, pb5, aglutinina de gameto masculino (mt+) de *Chlamydomonas*, aglutinina de gameto femenino (mt-) de *Chlamydomonas*, lectina, proteínas de unión a hidratos de carbono, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo antihidrato de carbono, anticuerpo antiflagelos, anticuerpo anti-Fus1, anticuerpos antiproteína de superficie celular). Entre los ejemplos de marcadores de selección se pueden incluir, aunque no se limitan a los mismos, kanamicina, fleomicina, bleomicina, higromicina o zeocina.

Transformación de las células hospedadoras

Las células transformadas se producen introduciendo ADN homólogo y/o heterólogo en una población de células diana y seleccionando las células que han absorbido el ADN. Por ejemplo, se pueden cultivar en un medio que contiene kanamicina transformantes que contienen ADN exógeno con un marcador seleccionable que proporciona resistencia a la kanamicina.

Las técnicas básicas utilizadas para la transformación y expresión en organismos fotosintéticos son parecidas a las utilizadas habitualmente para la *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies, e incluyen la transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o por polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, microinyección directa en los núcleos, introducción por raspado ("scrape loading") y electroporación. En la técnica se conocen métodos de transformación adaptados a un NVPO, por ejemplo, el cloroplasto de una cepa de algas. Estos métodos se han descrito en diversos textos sobre manipulación biológica molecular estándar (véase Packer & Glaser, 1988, "Cyanobacteria", Meth. Enzymol., vol. 167; Weissbach & Weissbach, 1988, "Methods for plant molecular biology," Academic Press, Nueva York, Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A laboratory manual," 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; y Clark M. S., 1997, Plant Molecular Biology, Springer, N.Y.). Estos métodos incluyen, por ejemplo, dispositivos biolísticos (véase, por ejemplo, Sanford, Trends In Biotech. (1988) 6: 299-302, patente US nº 4.945.050; electroporación (Fromm *et al*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1985) 82: 5824-5828); utilización de un rayo láser, electroporación, microinyección o

cualquier otro método capaz de introducir ADN en una célula hospedadora (por ejemplo, un NVPO).

La transformación de plastidios es un método rutinario y bien conocido para la introducción de un polinucleótido en un cloroplasto de célula vegetal (véase patentes de EE. UU. 5.451.513, 5.545.817 y 5.545.818; el documento WO 95/16783; McBride *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:7301-7305, 1994). En algunas formas de realización, la transformación de cloroplastos comprende la introducción de regiones de ADN de cloroplasto que flanquean una secuencia de nucleótidos deseada, lo que permite la recombinación homóloga del ADN exógeno en el genoma diana de cloroplasto. En algunos casos, se pueden utilizar secuencias de nucleótidos flanqueantes de entre 1 kb y 1,5 kb de ADN genómico de cloroplasto. Mediante este método, se pueden utilizar mutaciones puntuales en los genes ARNr 16S y rps12 de cloroplasto, que proporcionan resistencia a espectinomicina y estreptomycinina, como marcadores seleccionables para la transformación (Svab *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:8526-8530, 1990), y se pueden obtener transformantes homoplásmicos estables en una frecuencia de aproximadamente 1 por 100 bombardeos de hojas diana.

La transformación mediada por microproyectiles también se puede utilizar para introducir un polinucleótido en una célula vegetal (Klein *et al*, Nature 327:70-73, 1987). Este método utiliza microproyectiles, como el oro o el tungsteno, recubiertos con el polinucleótido deseado por precipitación con cloruro de calcio, espermidina o polietilenglicol. Las partículas de microproyectiles se aceleran y se introducen a alta velocidad en un tejido vegetal mediante un dispositivo tal como la pistola de partículas BIOLISTIC PD-1000 (BioRad; Hercules Calif. USA). Los métodos para la transformación utilizando métodos biolísticos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo: Christou, Trends in Plant Science 1:423-431, 1996). La transformación mediada por microproyectiles se ha utilizado, por ejemplo, para generar una variedad de especies vegetales transgénicas, incluidos el algodón, el tabaco, el maíz, el álamo híbrido y la papaya. También cultivos de cereales importantes, como el trigo, la avena, la cebada, el sorgo y el arroz se han transformado mediante administración mediada por microproyectiles (Duan *et al*, Nature Biotech. 14:494-498, 1996; Shimamoto, Curr. Opin. Biotech. 5:158-162, 1994). La transformación de la mayoría de las plantas dicotiledóneas es posible con los métodos descritos anteriormente. La transformación de plantas monocotiledóneas también se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante métodos biolísticos, tal como se ha descrito anteriormente, por transformación de protoplastos, electroporación de células parcialmente permeabilizadas, introducción de ADN con fibras de vidrio, el método de agitación de bolas de cristal y similares. La frecuencia de transformación se puede aumentar mediante la sustitución de ARNr recesivo o genes de resistencia a antibióticos de rProteína con un marcador seleccionable dominante, incluido, aunque sin limitarse al mismo, el gen bacteriano aadA (Svab y Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:913-917, 1993).

Fraciones de floculación

Para cosechar un producto de interés a partir de una célula hospedadora de la presente invención (por ejemplo, un NVPO), a menudo resulta útil separar eficientemente la célula hospedadora del líquido en el que se cultiva. En el pasado se han utilizado diversos métodos para separar el organismo del líquido. La centrifugación, por ejemplo, se ha utilizado con éxito en la separación de células en cultivos a pequeña escala a partir de los medios líquidos. Sin embargo, para las aplicaciones a gran escala, que por lo general comprenden el cultivo de un organismo en grandes cantidades de agua (por ejemplo, un estanque, un lago, un biorreactor, etc.), la centrifugación puede consumir mucho tiempo y/o ser costosa. La floculación es un enfoque alternativo a la separación de las células para aplicaciones a gran escala y a pequeña escala. Algunos floculantes químicos, como los metales pesados, plantean el problema de que el metal puede tenerse que eliminar del organismo floculado para los procesos posteriores (por ejemplo, purificación enzimática, producción de alimentos funcionales, transesterificación de triglicéridos, etc.). Por otro lado, las cepas de organismos (por ejemplo, NVPO) modificados por ingeniería genética para que expresen fracciones de floculación no presentan este problema de eliminación de un floculante peligroso, costoso o contaminante de los organismos y/o el medio líquido. Por consiguiente, un nuevo aspecto de la presente invención es la producción de un organismo modificado para que produzca una o más fracciones de floculación.

La fracción de floculación se puede incorporar a un organismo, ya sea fotosintético o no fotosintético, por transformación con vectores, como los descritos en la presente memoria. Las técnicas implicadas en estos procesos incluyen, aunque no se limitan a los mismos, el desarrollo del casete de expresión adecuado, la inserción (es decir, la transformación) del casete de expresión en una célula hospedadora y el cribado de la célula hospedadora que expresa la fracción de floculación deseada. En función del diseño del vector, la fracción de floculación puede ser expresada de manera constitutiva (por ejemplo, en todo momento) o de manera inducible (por ejemplo, inducida por la temperatura, inducida por quórum, etc.). Se pueden utilizar organismos fotosintéticos modificados capaces de expresar una o más fracciones de floculación para la floculación, con o sin la adición de otros compuestos. Por ejemplo, un organismo no fotosintético como la *E. coli* se puede transformar con el fin de producir una proteína de unión a hidratos de carbono, por ejemplo una lectina, o un anticuerpo fusionado a una proteína de superficie celular (por ejemplo, LppOmpA, beta-autotransportador, etc.), de modo que, cuando se expresa, la proteína de fusión está presente en la superficie celular y se une a múltiples organismos de interés, tales como un alga verde, para provocar la floculación. Alternativamente, un alga verde como la *C. reinhardtii* se puede transformar para que produzca una proteína de unión a hidratos de carbono, por ejemplo una lectina, o un anticuerpo fusionado a una proteína de superficie celular, por ejemplo GP1, de modo que la proteína de fusión se expresa en la superficie celular y se une a múltiples organismos de interés, tales como las algas verdes, para provocar la floculación.

Alternativamente, un organismo hospedador (por ejemplo, *C. reinhardtii*) se puede transformar para que produzca la proteína FhuA a partir de *E. coli*, y un segundo organismo hospedador -de la misma especie que el primer organismo o de una especie diferente- se puede transformar para que produzca la proteína pb5 de la cola del fago T5. FhuA y pb5 forman un complejo muy estable de estequiometría 1:1, por lo que, combinando las dos células hospedadoras transformadas en un tiempo deseado, o controlando la expresión de las dos fracciones de floculación en las diferentes cepas para que sólo expresen las fracciones de floculación en un tiempo determinado, la unión entre las dos fracciones provocará la floculación a través de la interacción entre las dos fracciones.

Habitualmente, una fracción de floculación se expresa de tal manera que está presente en la superficie exterior de la célula hospedadora (por ejemplo, en la pared celular y/o la membrana celular). En algunos casos, una fracción de floculación es secretada por la célula hospedadora en el medio circundante. Las técnicas estándar de biología molecular permiten el direccionamiento de una proteína expresada de forma recombinante a diversos compartimentos subcelulares de una célula hospedadora. Entre los ejemplos de dichos compartimentos subcelulares se incluyen la vesícula de Golgi, los lisosomas, el sistema de secreción, la pared celular o la membrana plasmática. Así, en algunos casos, los vectores útiles en la presente invención contienen secuencias de ADN que codifican uno o más polipéptidos especializados (por ejemplo, péptidos señal) capaces de dirigir las proteínas recombinantes a compartimentos subcelulares si el péptido señal está operativamente unido a la proteína recombinante.

Los candidatos para los genes que expresan fracciones de floculación se pueden obtener de una variedad de organismos, incluyendo eucariotas, procariotas o virus. En algunos casos, una fracción de floculación es un miembro de una pareja de unión de proteína. Las parejas de proteínas que forman complejos proteína-proteína fuertes son útiles como fracciones de floculación. Las proteínas autoagregantes, proteínas capaces de formar complejos multiméricos, también son útiles como floculantes. También se pueden utilizar fracciones de hidratos de carbono de las glucoproteínas (por ejemplo, los residuos arabinosilo, galactosilo, manosilo y ramnosilo), hidratos de carbono de la membrana y/o la pared celular (por ejemplo, ácido alginico, xilanos, mananos, agarosa, carragenano, porfirano, furcelerano, etc.) o proteínas que aumentan la producción de algunos hidratos de carbono o glucolípidos para inducir la floculación, ya que determinadas clases de hidratos de carbono son componentes conocidos de la formación de complejos proteínicos.

Las fracciones de floculación también se pueden expresar de forma recombinante en células hospedadoras y purificarse hasta un nivel útil (por ejemplo, hasta homogeneidad). Los floculantes purificados se pueden añadir a un cultivo de células diana para provocar la floculación. Habitualmente, dichos floculantes no plantean los mismos problemas que la utilización de floculantes de metales pesados. Por ejemplo, una lectina recombinante puede ser producida por una célula hospedadora (por ejemplo, secretada o producida en la superficie), recolectarse e introducirse en un cultivo del organismo que se pretende flocular.

El experto en la materia apreciará que se pueden utilizar diversos tipos de moléculas al poner en práctica los presentes métodos. En la presente invención se dan a conocer, a modo de ejemplo, diversas proteínas, hidratos de carbono, anticuerpos y otras fracciones que se pueden utilizar como fracción de floculación, ya sea cuando son expresadas por un microorganismo o mediante su incorporación al medio de cultivo líquido. Estos ejemplos pretenden proporcionar ejemplos ilustrativos de los tipos de moléculas que se pueden utilizar, y no pretenden ser limitantes.

Se sabe que las proteínas, como categoría, se unen y/o forman complejos con otras macromoléculas y compuestos. Como tales, las proteínas se pueden utilizar como fracciones de floculación. Las proteínas de unión a hidratos de carbono (por ejemplo, las lectinas), por ejemplo, son una categoría de proteína útil para una fracción de floculación. Las proteínas de unión a hidratos de carbono reconocen y se unen a una variedad de hidratos de carbono de la superficie celular, a fracciones de hidratos de carbono, a cadenas laterales de polisacáridos de las glucoproteínas, a proteínas glucosiladas, a glucopéptidos y/o a proteínas de la superficie celular. Por consiguiente, en una forma de realización, la lectina de tipo C se expresa en la pared celular de *C. reinhardtii* e induce la floculación uniéndose a una glucoproteína presente en la superficie de las células de *C. reinhardtii*. Entre los ejemplos de estas fracciones de floculación se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, ácido lisofosfatídico, lectina de tipo C, Gal/GalNAc, azúcares unidos en O, polisacáridos unidos en O, GlcNAc, fosfolipasa A2, GalNAc-SO₄, ácido siálico, glucoesfingolípidos, monocolato de glucosa, lipoarabinomanano, fosfatidil inositoles, hexosil-1-fosfoisoprenoides, manosil-fosfolípidos, α-galactosilceramida o galactósido terminal. Entre los ejemplos de proteínas de unión a hidratos de carbono se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, DC-SIGN, dectina-1, dectina-2, HECL, langerina, layilina, mincle, MMGL, E-selectina, P-selectina, L-selectina, DEC-205, Endo 180, receptor de manosa, receptor de fosfolipasa A2, sialoadhesina (siglec-1), siglec-2, siglec-3, siglec-4, siglec-5, siglec-6, siglec-7, siglec-8, siglec-9, siglec-10, siglec-11 y galectinas.

Otra categoría de proteínas que se pueden utilizar como fracciones de floculación es la de los anticuerpos. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos contra antígenos conocidos de la superficie celular, expresados en un organismo. La expresión de estos anticuerpos puede conducir a la formación de complejos antígeno-anticuerpo, que a continuación pueden dar lugar a la floculación de un organismo que expresa dicho anticuerpo, uniéndose

específicamente el anticuerpo a un antígeno de la superficie celular en la cepa transformada, o en una cepa u organismo diferente. Por ejemplo, la *C. reinhardtii* se puede transformar para que exprese de forma inducible un fragmento variable monocatenario (scFv) de un anticuerpo, que detecta un antígeno en la superficie externa de un organismo. El antígeno de superficie puede darse de forma natural en la superficie de *C. reinhardtii* o de otro organismo, o puede ser resultado de la transformación del organismo para producir el antígeno de superficie celular. Los anticuerpos utilizados pueden ser univalentes, multivalentes o polivalentes. En la técnica se conocen otros anticuerpos contra diversas glucoproteínas (véase, por ejemplo, Matsuda *et al*, J. Plant. Res., 100:373-384, 1987; Musgrave *et al*, Planta, 170:328-335, 1987). Los anticuerpos pueden anclarse en la superficie celular mediante la creación de una proteína de fusión que comprende una proteína expresada en la superficie celular, por ejemplo la membrana celular o la pared celular. Alternativamente, el anticuerpo se puede modificar para que sea secretado por la célula hospedadora al medio circundante y provocar la floculación. Se pueden añadir anticuerpos que reconocen los componentes de la pared celular o anticuerpos modificados de la célula hospedadora a los medios o a otro entorno de cultivo a fin de inducir la floculación. Se pueden utilizar como fracciones de floculación anticuerpos de los que se sabe que forman complejos estables con epítomos específicos. En algunos casos, se pueden utilizar anticuerpos que se dirigen a un epítomo natural.

Un primer organismo que expresa dichos anticuerpos se puede combinar con otro organismo que expresa el epítomo correspondiente con el fin de inducir la floculación tras la combinación. El epítomo correspondiente puede ser de procedencia natural o modificado genéticamente. Alternativamente, el epítomo correspondiente se puede añadir a los medios u otro entorno de cultivo cuando se desea la floculación. Los epítomos pueden estar acoplados a soportes de estado sólido, tales como bolas, mallas, tamices, etc., para facilitar la floculación. Entre los ejemplos de anticuerpos útiles para la presente invención se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, anticuerpo anti-etiqueta de HA, anticuerpo anti-etiqueta de His, anticuerpo anti-etiqueta de Myc, anticuerpo anti-etiqueta de AU1, anticuerpo anti-etiqueta de GST, anticuerpo anti-etiqueta de KT3, anticuerpo anti-etiqueta de MAT, anticuerpo anti-etiqueta de MBP, anticuerpo anti-etiqueta de S, anticuerpo anti-etiqueta de S1, anticuerpo anti-etiqueta de SNAP, anticuerpo anti-etiqueta de SRT, anticuerpo anti-etiqueta de V5, anticuerpo anti-etiqueta de VSV-G, anticuerpo anti-etiqueta de TAP y anticuerpo anti-Trx. El experto en la materia sabrá reconocer que una sola célula hospedadora puede expresar más de una fracción de floculación de una o más categorías. Por ejemplo, un organismo se puede transformar para que exprese dos anticuerpos diferentes, o un anticuerpo y una proteína de unión a hidratos de carbono.

En algunas formas de realización, una fracción de floculación es un anticuerpo a un epítomo de la superficie celular de una célula de interés. El epítomo de superficie celular puede estar presente en una proteína de superficie celular. Entre los ejemplos de dichas proteínas se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, HRP-2, PHC21, ISG-C1, LMR3, VSP (1, 2, 3, 4), HRP3, GP1, FAS1, FAS2, FAS3, E_GWH.1280.7.1, GAS30, MMP14, ZAP2-2, MIN1 o GOX1 de *C. reinhardtii*, y p150 de *D. salina*. Los métodos para producir anticuerpos para una determinada proteína son bien conocidos en la técnica y pueden comprender el cultivo de un organismo fotosintético; el fraccionamiento de una parte de la membrana y/o la pared celular del microorganismo; la inyección de esta fracción a un animal hospedador apropiado para la inmunización; extraer suero del animal inmunizado; y cribar, seleccionar y purificar uno o más anticuerpos que reaccionan a la fracción. También, por ejemplo cuando el animal inmunizado es un ratón, las células inmunes que producen el anticuerpo de interés se pueden someter a formación de hibridoma y técnicas de cultivo rutinarias para producir los anticuerpos monoclonales de interés. En otra forma de realización, las proteínas se purifican adicionalmente a partir de la fracción de membrana y se utilizan en un sistema de cribado de alto rendimiento como diana de la técnica de presentación de fagos, con lo que se identifican las secuencias de ADN que expresan una parte del polipéptido del anticuerpo que interactúa con la diana. Las técnicas de presentación de fagos son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente US nº 5.855.885; McCafferty *et al*, Nature, 348:552-54, 1990.

Otra categoría de proteínas que se pueden utilizar como fracciones de floculación incluye proteínas que forman una pareja de unión. Esta categoría incluye, entre otras, proteínas que forman complejos multiméricos y proteínas que forman un complejo con otra clase de proteína. Por ejemplo, la proteína FhuA de *E. coli* es un canal transportador de hierro monomérico con un solo dominio que atraviesa la membrana, que se puede sobreexpresar; la pb5 es una proteína de la cola del fago T5 que utiliza FhuA como receptor de fago. La interacción entre las dos proteínas es muy estable. Estas parejas de proteínas se pueden utilizar como fracciones de floculación. Por ejemplo, en una forma de realización, la FhuA se expresa en una cepa de *D. salina* y la pb5 se expresa en una segunda cepa de *D. salina*. Tras la combinación de las dos cepas, se produce la floculación debido a la interacción entre las dos proteínas. El experto en la materia sabrá reconocer que existen y se pueden utilizar muchas otras parejas de unión de proteínas. Para permitir la interacción entre algunas proteínas, puede ser necesario modificar las proteínas, de modo que se insertan en la membrana celular y/o la pared celular.

60 Control de los tiempos de floculación

Tener control sobre los tiempos de floculación puede ser ventajoso en algunos casos para controlar la floculación. Por ejemplo, mediante el control de los tiempos de floculación, un operador de un sistema de cultivo diana puede asegurar el uso eficiente de los nutrientes, el momento de la recolección, la cantidad de organismos cosechados y/o la producción máxima de producto. El experto en la materia sabrá reconocer que las condiciones óptimas pueden variar según diversos factores, pero estas determinaciones de la preparación del medio de cultivo son rutinarias.

Para las fracciones de floculación expresadas por un determinado organismo hospedador, los tiempos de floculación se pueden controlar mediante la incorporación de uno o más elementos reguladores (por ejemplo, promotores) en el diseño de un casete de expresión. Este enfoque puede permitir la expresión de una fracción de floculación sólo en un momento determinado. Como se desprende de la presente memoria, están disponibles diversas rutas para controlar los tiempos de la floculación. La presente memoria expone enfoques ilustrativos para el control de los tiempos de floculación, pero no pretende limitarlos a los enfoques concretos mencionados en el presente documento.

Para la expresión de algunas fracciones de floculación, se pueden utilizar elementos reguladores que dan lugar a una expresión constitutiva. Por consiguiente, se espera que la fracción de floculación bajo el control de dichos elementos reguladores se produzca durante toda la vida de la célula hospedadora. Entre los ejemplos de elementos reguladores se incluyen la región 35S o 19S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor de cubierta del TMV, los promotores de nopalina sintasa, manopina sintasa u octopina sintasa de *Agrobacterium*, un promotor celular, el promotor de la chalcona sintasa, un promotor de actina, un promotor de adhl, un promotor de ubiquitina o un promotor de patatina. Para inducir la floculación, dos cepas independientes que expresan de forma constitutiva una parte de una pareja de floculación (por ejemplo, una pareja anticuerpo-antígeno, una pareja de unión de proteína, etc.) se pueden combinar cuando se desea la floculación. En estos casos, la fracción de floculación en una cepa puede ser de origen natural (por ejemplo, la primera cepa produce una lectina recombinante que reconoce una glucoproteína de la segunda cepa). Alternativamente, la floculación de una única cepa se puede inducir mediante la adición del segundo miembro de una pareja de floculación al cultivo o el entorno de la cepa cuando se desea la floculación. En otro enfoque, las células hospedadoras que contienen un miembro de una pareja de floculación que se expresa de forma constitutiva se pueden cultivar en combinación con otra cepa que expresa el segundo miembro de la pareja de floculación en condiciones inducibles. En estos casos, la inducción de la expresión del segundo miembro de la pareja de floculación en la segunda cepa provoca la floculación.

Se pueden utilizar elementos reguladores inducibles para controlar la expresión de una fracción de floculación. En estas formas de realización, el organismo, por ejemplo un organismo fotosintético no vascular, puede mantenerse en cultivo sin que exprese la fracción de floculación hasta que se desea que tenga lugar la floculación. La inducción de la expresión se puede llevar a cabo mediante la introducción de un factor extrínseco (por ejemplo, exposición a la luz, donde un promotor inducible mediante luz controla la expresión de la fracción de floculación) o por la aparición de un factor necesario para la expresión (por ejemplo, alcanzar una determinada densidad celular, donde un promotor sensible al quórum controla la expresión de una fracción de floculación). Entre los factores extrínsecos que se pueden utilizar para inducir la expresión de una fracción de floculación se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, sustancias químicas, la luz, la densidad de cultivo, la temperatura, hormonas o nutrientes. Entre los ejemplos no limitativos de promotores inducibles que responden a factores extrínsecos a la célula y que se pueden utilizar para la presente invención se incluyen: el promotor de la proteína de choque térmico Gmhsp17.3-B de la soja (Prandl *et al*, Plant Mol. Physiol. 31:157-62, 2004); promotores químicamente inducibles (por ejemplo, el promotor IPTG/lac); el promotor inducible de fosfato/deficiencia de fosfato (por ejemplo, la patente US nº 6.175.060); el promotor de L-arabinosa/ara B; el promotor de ácido 3-β-indoiloacrilico/Tip, el promotor de ácido salicílico/PR-1 (por ejemplo, la patente US nº 5.689.044); promotores inducibles por galactosa, tales como GAL1, GAL7, GAL10 (patente US nº 5.972.664); promotor de metal/metalotionina; el promotor FUS1, que es inducible por una feromona (por ejemplo, la patente US nº 5.063.154); promotores inducibles mediante luz (por ejemplo, subunidad del promotor de la ribulosa bífosfato carboxilasa, véase también la patente US nº 6.858.429); promotores sensibles al quórum, que detectan la densidad celular en un medio líquido y se pueden utilizar para inducir la floculación de forma automática cuando el cultivo alcanza una determinada densidad (por ejemplo, Whiteley *et al*, Journal of Bacteriology, 183:529-5534, 2001); También se ha descrito un sistema promotor sensible a la temperatura que utiliza un promotor P_L (véase, por ejemplo, la patente US nº 4.711.845). El experto en la materia sabrá reconocer que se pueden utilizar uno o más elementos reguladores endógenos para controlar la expresión de una fracción de floculación, por ejemplo, incluyendo un promotor endógeno en un casete de expresión o insertando un ácido nucleico que codifica una fracción de floculación en un genoma diana, de modo que será controlado por un elemento regulador nativo (por ejemplo, por recombinación homóloga).

Otro tipo de promotor incluye los promotores inducidos por deficiencia de nitrógeno. La deficiencia de nitrógeno provoca la formación de gametos en determinados NVPO, tal como la *C. reinhardtii*. Extrayendo el nitrógeno o limitando la cantidad de nitrógeno disponible, se puede inducir la floculación utilizando promotores sensibles a la deficiencia de nitrógeno para controlar la expresión de una fracción de floculación. Se pueden utilizar aglutininas de tipo de apareamiento, que están expresadas de forma natural en algunos NVPO en condiciones de deficiencia de nitrógeno, aunque normalmente no a los niveles que provocarían la floculación en un cultivo grande. Por consiguiente, en una forma de realización, el aumento de la producción (por ejemplo, mediante la transformación de una cepa hospedadora) de una o más aglutininas puede provocar la floculación.

Condiciones de cultivo: estanques abiertos y biorreactores cerrados

En muchos organismos, incluidos los organismos fotosintéticos no vasculares (NVPO), el crecimiento rutinario se puede llevar a cabo a temperatura ambiente en 1,5% de agar, ya sea en placas o tubos, mientras que el crecimiento activo se lleva a cabo típicamente en cultivo líquido. El crecimiento óptimo se da, habitualmente, a 20-25°C, aunque

las células pueden sobrevivir a la exposición a 35°C y se pueden cultivar a temperaturas más bajas. Son normales en líquido densidades celulares de 1-5 x 10⁶ células/ml, con agitación o mezclado, y una tasa de proliferación típica puede producir un aumento de diez veces en el número de células por día, dependiendo de las condiciones de cultivo. El almacenamiento prolongado de las células se puede lograr mediante su extensión en placas, el sellado de las mismas con PARAFILM™ y su almacenamiento en luz tenue a 10-15°C. Alternativamente, las células se pueden extender o introducir en tubos de agar, taparse y cultivarse como se ha mencionado anteriormente. Los dos métodos permiten el almacenamiento durante varios meses. Para un almacenamiento más prolongado, las células se pueden cultivar en cultivo líquido hasta la fase logarítmica tardía y a continuación llevarse a una concentración del 7% con DMSO estéril y almacenarse a -80°C. También se recomienda, para un almacenamiento prolongado, congelar el recipiente en nitrógeno líquido en presencia de metanol.

Habitualmente, los NVPO se pueden cultivar en un medio sencillo definido con la luz como única fuente de energía. En la mayoría de los casos, unas bombillas fluorescentes situadas a una distancia de 1-2 pies resultan adecuadas para suministrar la energía necesaria para el crecimiento. El burbujeo de aire o CO₂ al 5% puede mejorar la tasa de proliferación. Se pueden sincronizar las células de algunos NVPOs encendiendo y apagando las luces a intervalos regulares (12:12 o 14:10 horas de luz:oscuridad).

Dado que los organismos fotosintéticos, como las algas, necesitan luz solar, CO₂ y agua para crecer, se pueden cultivar en estanques y lagos abiertos. Debido a que se trata de sistemas abiertos, son mucho más vulnerables a la contaminación. Una de las dificultades que se dan al utilizar sistemas abiertos es que el NVPO de interés puede no ser necesariamente el más rápido de reproducir. Esto genera un problema en los casos en que otras especies colonizan el medio líquido. Además, en los sistemas abiertos, hay un control relativamente menor sobre la temperatura del agua, la concentración de CO₂ y las condiciones de luz. Esto provoca que la temporada de crecimiento dependa en gran medida de la ubicación y, salvo en las zonas tropicales, se limita a los meses más cálidos. Si bien se acaban de mencionar las desventajas de los "sistemas abiertos", una de las ventajas de este tipo de sistemas es que, por lo general, tiene menores costes de producción.

Otro enfoque es la utilización de un sistema semicerrado, por ejemplo cubriendo el estanque o piscina con un invernadero. Si bien, por lo general, esto da lugar a un sistema más pequeño, también resuelve muchos de los problemas asociados con los sistemas abiertos. Permite el cultivo de un mayor número de especies, permite que las especies que se cultivan se mantengan dominantes, prolonga la temporada de crecimiento y, si el invernadero está climatizado, la producción se puede prolongar durante todo el año. También es posible aumentar la cantidad de CO₂ en estos sistemas semicerrados, aumentando de nuevo de la tasa de proliferación de las algas.

Una variación del sistema de estanque es un estanque artificial, por ejemplo, un estanque de circulación o tipo "raceway". En estos estanques, las algas, el agua y los nutrientes circulan por una "pista de carreras". Al proporcionar movimiento al agua, por ejemplo mediante el uso de paletas, las algas se mantienen en suspensión en ella y se recirculan a la superficie con una frecuencia regular. Normalmente, los estanques de tipo "raceway" se mantienen poco profundos, ya que las algas necesitan estar expuestas a la luz solar y ésta sólo puede penetrar en el agua del estanque hasta cierta profundidad. Sin embargo, la profundidad se puede variar según la longitud o longitudes de onda utilizadas por un organismo. Los estanques se pueden hacer funcionar en régimen continuo, alimentándolos constantemente con CO₂ y nutrientes, mientras que el agua que contiene las algas se extrae por el otro extremo.

Alternativamente, las algas se pueden cultivar en estructuras cerradas, tales como fotobiorreactores, donde el entorno se mantiene bajo un control más estricto que en los estanques abiertos. Si bien los costes de construcción y funcionamiento de un fotobiorreactor son más altos que en los estanques abiertos, la eficiencia y el rendimiento de estas estructuras pueden ser significativamente mayores, compensando así la desventaja inicial en cuanto a costes en el medio y largo plazo.

Un fotobiorreactor es un biorreactor que incorpora algún tipo de fuente de luz. Un estanque cubierto con un invernadero podría considerarse también un fotobiorreactor. Dado que se trata de sistemas cerrados, todo lo que las algas necesitan para crecer (dióxido de carbono, agua y luz) debe ser introducido en el sistema.

Los fotobiorreactores se pueden configurar de modo que se lleve a cabo una cosecha continua (la mayoría de los sistemas de cultivo más grandes) o mediante cosechas por lotes (como el cultivo en bolsa de polietileno). Un fotobiorreactor por lotes se configura con los nutrientes y las semillas de las algas y se deja en cultivo hasta que se cosecha el lote. Un fotobiorreactor en régimen continuo se cosecha continuamente, por ejemplo diariamente o con mayor frecuencia. Algunos tipos de fotobiorreactores comprenden vidrio, tubos de plástico, tanques y fundas o bolsas de plástico. Algunas fuentes que pueden utilizarse para proporcionar la energía lumínica necesaria para mantener la fotosíntesis son bombillas fluorescentes, luces LED o la luz solar natural.

Algunos de los organismos que se pueden utilizar para poner en práctica la presente invención son los halófilos. Por ejemplo, la *D. salina* puede crecer en agua de océanos, lagos salados (con una salinidad de 30-300 partes por mil) y en medios de salinidad alta (por ejemplo, un medio artificial de agua de mar, agua de mar con nutriente agar, medio de agua salobre, medio de agua de mar, etc.). En algunas formas de realización, una célula hospedadora que

comprende un vector, tal como se describe en el presente documento, se puede cultivar en un medio líquido con una concentración molar de cloruro de sodio de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3 o más elevada. El experto en la materia sabrá reconocer que también pueden estar presentes otras sales (sales de sodio, sales de calcio, sales de potasio, etc.) en los medios líquidos.

Cuando se utiliza un organismo halófilo, éste se puede transformar con cualquiera de los vectores descritos la presente memoria. Por ejemplo, la *D. salina* se puede transformar con un vector capaz de insertarse en el genoma nuclear y que contiene ácidos nucleicos que codifican una fracción de floculación (por ejemplo, un anticuerpo antiproteína de superficie celular, una proteína de unión a hidratos de carbono, etc.). A continuación, los organismos halófilos transformados pueden cultivarse en entornos muy salinos (por ejemplo, lagos salados, estanques salados, medios de salinidad elevada, etc.) para producir los productos de interés (por ejemplo, isoprenoides, ácidos grasos, enzimas degradadoras de biomasa, etc.). En algunos casos, la fracción de floculación puede ser no funcional en condiciones de salinidad elevada. En estas formas de realización, la floculación se puede inducir por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento y/o reduciendo la salinidad (por ejemplo, diluyendo el medio líquido). Alternativamente, la fracción de floculación puede ser funcional en condiciones de alta salinidad y la floculación se puede controlar por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La floculación de los organismos puede tener lugar en condiciones de alta salinidad, o el medio líquido se puede diluir hasta obtener una salinidad inferior a fin de permitir su unión. El aislamiento de cualquier producto de interés producido por el organismo puede comprender la eliminación del organismo transformado del medio de alta salinidad antes de la extracción del producto del organismo. En los casos en que el producto se secreta en el medio circundante, puede ser necesario desalinizar el medio líquido antes de cualquier procesamiento posterior del producto.

Métodos de floculación

La presente memoria da a conocer métodos para la floculación de un organismo hospedador. Tal como se describe, las fracciones de floculación pueden ser extrínsecas o intrínsecas a un organismo hospedador. Las fracciones de floculación extrínsecas pueden incluir proteínas expresadas recombinantemente y purificadas, hidratos de carbono u otras moléculas biológicas capaces de unirse a la superficie celular de un NVPO. Entre las fracciones de floculación intrínsecas se pueden incluir proteínas de origen natural o recombinantes modificadas por ingeniería genética para que se expresen en el NVPO transformado, otros materiales biológicos, tales como hidratos de carbono de origen natural, lípidos, glucolípidos producidos en cantidades naturales o que se producen en una cantidad más elevada debido a la modificación genética del organismo transformado. Por consiguiente, se puede utilizar cualquier método que permita la interacción, como mínimo, de dos miembros de una pareja de floculación.

Por ejemplo, la floculación se puede inducir mediante la adición de un miembro de una pareja de floculación, que se une a una fracción de floculación intrínseca (por ejemplo, una lectina que se une a una glucoproteína de la pared celular). La figura 2 muestra una ilustración de este enfoque con la utilización de una lectina. Algunos pasos se omiten en la ilustración para mayor simplicidad. Para iniciar el cultivo, se obtiene una cepa de un NVPO, tal como *C. reinhardtii*, *D. salina*, *D. tertiolecta* o *H. pluvialis*, a partir del cultivo madre. Un cultivo madre puede ser un cultivo líquido activo o proceder de una reserva congelada. Una vez que el cultivo madre se introduce en el medio de cultivo, se expande mediante equipos de laboratorio a pequeña escala. En este momento, se puede hacer un seguimiento en el cultivo de las características de crecimiento, la salud, la contaminación u otras medidas que se llevan a cabo habitualmente para garantizar el correcto mantenimiento de los NVPO. También se puede llevar a cabo en este instante un fenotipado y/o genotipado de la cepa a fin de confirmar la identidad de la misma. Se utilizan cultivos a pequeña escala como cultivos semilla para cultivos a gran escala. El cultivo a gran escala se puede llevar a cabo en fotobiorreactores, estanques semicerrados, estanques abiertos o lagos (no representados en la figura 2). Varios lotes de un cultivo a pequeña escala se pueden sembrar en un recipiente de cultivo a gran escala. La relación de volumen de siembra con respecto a volumen de recepción se puede determinar en el momento de la siembra de acuerdo con parámetros tales como la densidad óptica y la tasa de proliferación del cultivo o cultivos a pequeña escala. Para la preparación de medios para el cultivo a gran escala, se pueden llevar a cabo una esterilización en autoclave, una adición de nutrientes a medios reciclados, una evaluación del estado de los medios reciclados y una medición del pH, la salinidad y la conductividad de los medios. Durante el cultivo a gran escala, se lleva a cabo un control de calidad. Los criterios de control de calidad incluyen el muestreo y el cribado de contaminación, la divergencia de cepas, la cinética de crecimiento, el nivel de oxígeno, el nivel de nitrógeno, la salinidad del líquido, el pH del medio líquido, el muestreo de las células en cultivo para medir el contenido de aceite, la relación peso seco/peso húmedo y la densidad óptica del cultivo. En una forma de realización ilustrativa, cuando la floculación se considera apropiada, se añade lectina. La lectina se puede comprar o preparar in situ. La producción de lectina recombinante se conoce en la técnica. Por ejemplo, se han descrito métodos y composiciones para producir lectina en microorganismos en la patente US nº 4.870.015. La lectina expresada de forma recombinante se puede purificar a homogeneidad y añadirse al cultivo del NVPO para potenciar la floculación. En algunos casos, el NVPO cultivado puede expresar una fracción de floculación de origen natural al que se une la lectina, o se puede modificar genéticamente para que produzca mayores cantidades de una fracción de floculación de origen natural, o se puede modificar genéticamente para que produzca una fracción de floculación exógena. También se pueden utilizar floculantes distintos de la lectina (no mostrados en la figura 2) como floculante individual o junto con lectinas. Tras la floculación, se cosecha la masa celular floculada del NVPO. Se pueden llevar a cabo cualquiera de entre los

diversos métodos de recolección conocidos en la técnica, que van desde el tamizado con un filtro hasta un sofisticado sistema robótico para recolectar, exprimir y compactar la masa floculada de NVPO.

En la figura 3 se muestra un enfoque alternativo. Algunos pasos se omiten en la ilustración para mayor simplicidad. El proceso presentado comprende la utilización de un organismo modificado genéticamente (por ejemplo, un NVPO) que expresa una o más fracciones de floculación. En la figura 3, la fracción de floculación es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de fragmentos variable monocatenario (scFv). Se pueden aplicar otros anticuerpos distintos de un anticuerpo scFv al procedimiento de floculación que se ilustra en la figura 3. Tampoco se muestran, pero son aplicables a los pasos ilustrados en la figura 3, las fracciones de floculación que se pueden polimerizar. Por ejemplo, un monómero de actina puede formar un polímero de actina. Se construye un casete de expresión que codifica un anticuerpo y se incorpora a un vector de direccionamiento apropiado para el direccionamiento al genoma nuclear. Este casete de expresión contiene un elemento regulador que permite la expresión del anticuerpo. Dicho elemento regulador puede ser un elemento constitutivamente activo que permite que se lleven a cabo constantemente las transcripciones del anticuerpo en la célula. El elemento regulador puede ser un elemento inducible que requiera una señal extrínseca para iniciar la transcripción del anticuerpo. El organismo se transforma utilizando procedimientos apropiados. Las células diana correctas se seleccionan mediante técnicas de biología molecular conocidas en la técnica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa o el cribado en un medio antibiótico seleccionable. Una parte de las células seleccionadas se crioconservan, mientras que el resto se utiliza para iniciar un cultivo líquido a pequeña escala, por ejemplo, tal como se describe en la figura 2. Cuando la floculación se considera apropiada, la expresión de la fracción de floculación se induce proporcionando la señal de inducción extrínseca. La floculación puede ser progresiva en función de la cantidad o intensidad de la señal de inducción extrínseca. El grado de floculación puede estar ligado a la densidad celular si se utiliza un elemento constitutivamente activo para expresar la fracción de floculación. Tras la floculación, se cosecha la masa celular floculada del NVPO. Se pueden llevar a cabo cualquiera de entre los diversos métodos de recolección conocidos en la técnica, que van desde una simple tecnología de tamizado con filtro hasta un sofisticado sistema robótico para recolectar, exprimir y compactar la masa floculada de NVPO.

En otros casos, un miembro de la pareja de floculación puede ser secretado por una célula hospedadora modificada genéticamente e inducir la floculación tras la unión con el segundo miembro de la pareja de floculación presente en esa o en otra célula. En otros casos, un miembro de una pareja de floculación se puede fijar sobre una fase sólida (por ejemplo, una bola, una malla, un tamiz) a fin de inducir la floculación de una cepa hospedadora que expresa el otro miembro de la pareja de floculación.

La floculación se puede inducir mediante la combinación de cultivos cultivados por separado en cualquier proporción comprendida entre 1:1 y 1:10, donde cada uno de los diferentes cultivos expresan un miembro de una pareja de floculación (complejo de unión de dos miembros) o un complejo de floculación (complejo de unión de tres o más miembros). En la figura 4 se muestra un enfoque general. Algunos pasos se omiten para mayor simplicidad. En la figura 4, la pareja de floculación está constituida por FhuA y pb5, expresadas en cepas cultivadas por separado, y la floculación se induce mediante la combinación de las cepas. En este esquema, los fracciones de floculación no son capaces de llevar a cabo ningún autorreconocimiento ni ninguna autopóimerización. Para flocular, al como se ilustra, estas fracciones de floculación necesitan su presencia mutua. Otras fracciones de floculación que forman una pareja o un complejo también se pueden aplicar al esquema ilustrado en la figura 4. La construcción del casete de expresión, la introducción del elemento regulador, la incorporación en un vector adecuado, las etapas de transformación, selección, cultivo a pequeña o gran escala u otras etapas según la presente invención se han descrito anteriormente.

La floculación se puede inducir mediante la regulación inducible de la expresión de un miembro de una pareja de floculación, por ejemplo, por: 1) exposición de un cultivo a oscuridad y luz, donde una fracción de floculación está controlada por un elemento regulador inducible; 2) aumentar la temperatura del cultivo a 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C o 43°C durante un breve período comprendido entre varios segundos o varios minutos a unas pocas horas; 3) aumentar la densidad celular del cultivo a aproximadamente 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} células/ml o más; 4) añadir nitrógeno al cultivo, por ejemplo en forma de nitrato, durante aproximadamente 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, 135 min, 150 min, 165 min, 180 min, 195 min, 210 min, 225 min, 240 min, 255 min, 270 min, 285 min, 300 min, 315 min, 330 min, 345 min, 360 min, 375 min, 390 min, 405 min, 420 min, 435 min, 450 min, 465 min, 480 min, 495 min, 510 min, 525 min, 540 min, 555 min, 570 min, 585 min, 600 min, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 24 horas o más; y/o 5) privar de nitrógeno al medio de cultivo durante aproximadamente 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, 135 min, 150 min, 165 min, 180 min, 195 min, 210 min, 225 min, 240 min, 255 min, 270 min, 285 min, 300 min, 315 min, 330 min, 345 min, 360 min, 375 min, 390 min, 405 min, 420 min, 435 min, 450 min, 465 min, 480 min, 495 min, 510 min, 525 min, 540 min, 555 min, 570 min, 585 min, 600 min, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 24 horas o más.

En la figura 5 se muestra un ejemplo de cultivo de dos cepas en el mismo cultivo, donde los dos miembros de una pareja de floculación se controlan de manera inducible. Algunos pasos se omiten en la ilustración para mayor

simplicidad. En la figura 5, la pareja de floculación comprende las dos aglutininas de tipo de apareamiento. En esta figura, dos cepas de *C. reinhardtii* están genéticamente modificadas para expresar una mayor cantidad de aglutinina de tipo de apareamiento (por ejemplo, cada cepa produce un miembro de la pareja de floculación), pero bajo el control de los elementos de origen natural sensibles a la deficiencia de nitrógeno. En el NVPO transformado, la aglutinina expresada se dirige a una zona más amplia del cuerpo celular que los flagelos para potenciar una floculación eficiente. El direccionamiento de la aglutinina se logra mediante la inserción de secuencias de ADN que codifican un péptido señal de direccionamiento a la pared celular en el casete de expresión. La inducción de la aglutinina se potencia por el agotamiento del nitrógeno en el medio de cultivo a medida que crecen los cultivos. El momento óptimo para la floculación se puede modificar aumentando o disminuyendo la cantidad de nitrógeno. Al llegar a la deficiencia de nitrógeno, las dos cepas empezarán a aumentar la producción de su fracción de floculación individual y se producirá la floculación.

Reciclaje de los medios

Una ventaja de la utilización de fracciones de floculación modificadas genéticamente y/o expresadas de forma natural, tal como se describe en el presente documento, es el reciclaje del medio líquido. El reciclaje de los medios (por ejemplo, medios de laboratorio, agua de estanque, agua de lago, contenido del biorreactor, etc.) es económicamente ventajoso, especialmente en las operaciones a gran escala. Por ejemplo, en un sistema de estanque de circulación controlado, el medio líquido se puede reciclar permitiendo el flujo continuo del líquido a la vez que se añaden continuamente nutrientes. En otra forma de realización, en un sistema de fotobiorreactor cerrado, el reciclaje puede comprender la extracción de la masa de NVPO floculada; la medición del pH de los medios; la medición de la cantidad de cada nutriente presente en el líquido; el ajuste de los nutrientes al nivel óptimo; la esterilización del líquido en autoclave; y/o la devolución de los medios para un nuevo cultivo.

Debe apreciarse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el único propósito de describir formas de realización particulares y no pretende limitar la presente invención. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado entendido comúnmente por el experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica se puede utilizar cualquier método y cualquier material similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la evaluación de la presente invención, en la presente memoria se describen ejemplos específicos de materiales y métodos adecuados.

Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, ha de interpretarse que las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” cubren los referentes en singular y en plural, a menos que el contenido o el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un “polipéptido” incluye dos o más de dichos polipéptidos. Los términos “que comprenden”, “que tienen”, “que incluyen” y “que contienen” deben interpretarse como términos indefinidos (es decir, con el significado “que incluyen, pero no se limitan a”), a menos que se indique lo contrario.

La enumeración de intervalos de valores en el presente documento pretende únicamente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora a la presente descripción como si estuviera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario o que esto quede claramente contradicho de algún modo por el contexto. La utilización de cualquiera y de todos los ejemplos, o de expresiones ilustrativas (por ejemplo, “tal como”), en el presente documento, está destinada únicamente a describir mejor la invención, y no supone ninguna limitación en el alcance de la presente invención, a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la presente memoria debe interpretarse como indicadora de que un elemento cualquiera no reivindicado es esencial para la práctica de la presente invención. Los encabezamientos utilizados en la descripción de la presente invención se incluyen únicamente para mayor comodidad, y no pretenden limitar el alcance de la presente memoria.

En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio referidos a cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de los ácidos nucleicos y química de las proteínas que se describen a continuación son bien conocidos y habitualmente utilizados por los expertos en la técnica. Según la presente invención, el experto en la materia puede utilizar técnicas comunes de ADN recombinante, técnicas de biología molecular, técnicas de genética molecular y técnicas de microbiología. Por ejemplo, técnicas como las descritas en Sambrook, Goeddel, supra, y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubel *et al*, eds., Current Protocols, joint venture entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1994, complementado hasta 1999) (en adelante, “Ausubel”), DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, vols. I-II (Glover ed. 1985); Animal Cell Culture (Freshney ed. 1986) se pueden utilizar para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de clonación, métodos de cultivo celular, transfección y transformación, e incorporación de transgenes, por ejemplo, electroporación, inyección, pistola de genes, impresión a través de la piel y lipofección. En general, la síntesis de oligonucleótidos y las etapas de purificación se llevan a cabo según las especificaciones. Las técnicas y procedimientos se llevan a cabo generalmente según métodos convencionales en la técnica y según diversas referencias generales indicadas a lo largo del presente documento. Se cree que dichos procedimientos son bien conocidos por el experto en la materia y se indican para mayor

comodidad del lector.

Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito determinadas formas de realización, el experto en la materia sabrá apreciar que dichas formas de realización se indican únicamente a título ilustrativo. El experto en la materia sabrá reconocer numerosas variaciones, modificaciones y sustituciones que pueden llevarse a cabo sin apartarse de la invención. Debe apreciarse que pueden utilizarse diversas alternativas a las formas de realización descritas en el presente documento a la hora de poner en práctica la presente invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la presente invención y que los métodos y estructuras incluidos dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes queden cubiertos de este modo.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de lectinas recombinantes en *E. coli*

Se introdujeron ácidos nucleicos que codificaban lectinas en *E. coli*. El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1A. En este ejemplo, el segmento etiquetado "Transgén 1" es el gen que codifica las lectinas de *H. pomatia* (SEC ID nº: 1), *L. culinaris*, *T. vulgaris* (SEC ID nº: 2) o *C. ensiformis*. El segmento etiquetado "5'UTR" es el promotor T7 y el segmento etiquetado "3'UTR" es el terminador T7. Una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG se diseñaron en el extremo 3' del gen para facilitar los estudios de caracterización y visualización. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

El ADN transformante se introdujo en células BL21(DE3)pLysS competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las colonias se cultivaron en 5 ml de caldo de Luria (LB) en presencia de 50 µg/ml de kanamicina. Se centrifugaron 100 µl del cultivo a OD₆₀₀ = 1 y se eliminó el sobrenadante. Los gránulos se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech).

Para determinar la actividad de las lectinas recombinantes, se cultivaron 4 l de cada cepa y se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a 4°C y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 35 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 30 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. El sobrenadante se transfirió y se aplicó 1 ml de resina de Ni-NTA (Qiagen) durante 1 hora. La resina se recogió, se lavó con 30 volúmenes de columna de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se eluyó con 5 ml de TBS e imidazol 400 mM a pH 7,5. A continuación, el eluato se concentró hasta una concentración final de 5 mg/ml utilizando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore). A continuación, la proteína purificada se conjugó con FITC (isotiocianato de fluoresceína) utilizando un kit de etiquetado de FITC (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. A continuación, las células de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus dimorphus* se mezclaron con la proteína marcada con FITC para mostrar su actividad. Los resultados de varias lectinas representativas se muestran en la figura 6.

Ejemplo 2. Producción de proteínas de fusión de supercántigo y lectina en *E. coli*

Se fusionaron los ácidos nucleicos que codifican las lectinas de *H. pomatia* y *L. culinaris* en proteínas supercántigo de híbrido lipoproteína-proteína A de la membrana externa (Lpp-OmpA) o el β-autotransportador de *Neisseria gonorrhoea* (SEC ID nº: 3; SEC ID nº: 4; SEC ID nº: 5) en *E. coli*. El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1B. En este ejemplo, el segmento etiquetado "Transgén 1" es el gen que codifica la lectina de *H. pomatia*. El segmento etiquetado "Transgén 2" es el gen que codifica la lectina de *L. culinaris*. El segmento etiquetado "5'UTR" es el promotor T7, el segmento etiquetado "3'UTR" es el terminador T7, el segmento etiquetado "Supercántigo 1" es Lpp-OmpA y el segmento etiquetado "Supercántigo 2" es el β-autotransportador. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG entre el transgén y el supercántigo. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

El ADN transformante se introdujo en células BL21(DE3)pLysS competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las colonias se cultivaron en 5 ml de caldo de Luria (LB) en presencia de 50 µg/ml de kanamicina. Se centrifugaron 100 µl del cultivo a $OD_{600} = 1$ y se eliminó el sobrenadante. Los gránulos se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech).

Para determinar si la fusión lectina-supercóntigo estaba correctamente insertada en la membrana plasmática, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 25 ml de un cultivo de $OD_{600} = 1$ a 5000 x g durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a 4°C y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a 540000 x g en un rotor TLA 100.3 (Beckman) durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados se muestran en la figura 8.

Con el fin de caracterizar la actividad de la proteína de unión a azúcar que se presenta en la superficie celular, se llevaron a cabo experimentos de sedimentación. La *E. coli* transformada para producir una proteína de fusión compuesta de la lectina de *L. culinaris* y la proteína supercóntigo β -autotransportador se cultivó hasta una $OD_{600} = 1,6$. El cultivo se centrifugó y los gránulos se resuspendieron hasta una $OD_{600} = 30$ utilizando medio TAP. Se añadieron cantidades variables de cultivo (0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 100 µl, 250 µl y 500 µl, correspondientes a una OD_{600} final = 0, 0,02, 0,04, 0,08, 0,160, 0,400, 1,00, 2,00) a 7 ml de *S. dimorphus* cultivada en medio TAP. Se añadieron 500 µL de BL21(DE3) a 7 ml de *S. dimorphus* como control negativo. Las mezclas se agitaron suavemente durante 30 minutos antes de la sedimentación. Se tomaron fotografías (figura 8) en los instantes 0 y 90 minutos a fin de visualizar la actividad.

Ejemplo 3. Producción de fusiones supercóntigo-scFv en *E. coli*

Un anticuerpo de fragmentos variables monocatenarios (scFv) contra antígenos de superficie de algas se fusionó en proteínas supercóntigo de híbrido lipoproteína-proteína A de la membrana externa (Lpp-OmpA) y se introdujo en *E. coli* (SEC ID n°: 16). El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1C. En este ejemplo, el segmento etiquetado "Transgén 1" es el gen que codifica scFv5. El segmento etiquetado "5'UTR" es el promotor T7, el segmento etiquetado "3'UTR" es el terminador T7, el segmento etiquetado "Supercóntigo 1" es Lpp-OmpA. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG entre el transgén y el supercóntigo. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

El ADN transformante se introdujo en células BL21(DE3)pLysS competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las colonias se cultivaron en 5 ml de caldo de Luria (LB) en presencia de 50 µg/ml de kanamicina. Se centrifugaron 100 µl del cultivo a $OD_{600} = 1$ y se eliminó el sobrenadante. Los gránulos se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech).

Para determinar si la fusión LppOmpA-scFv estaba correctamente insertada en la membrana plasmática, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 25 ml de un cultivo de $OD_{600} = 1$ a $5000 \times g$ durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a $4^{\circ}C$ y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a $30000 \times g$ durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a $540000 \times g$ en un rotor TLA 100.3 (Beckman) durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados de un constructo representativo de la fusión LppOmpA-scFv5 se muestran en la figura 9.

Ejemplo 4. Producción de lectinas secretadas, recombinantes, en *P. pastoris*

Los ácidos nucleicos que codifican lectinas, tales como las de *H. pomatia*, *L. culinaris*, *T. vulgaris* y *C. ensiformis* se pueden introducir en *P. pastoris*. El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1A. En este ejemplo, el segmento etiquetado "Transgén 1" es el gen que codifica las lectinas de *H. pomatia*, (SEC ID n°: 1), *L. o vulgaris* (SEC ID n°: 2) o *C. ensiformis*. El segmento etiquetado "5'UTR" es el promotor AOX1 y el segmento etiquetado "3'UTR" es el terminador AOX1. Una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG se diseñaron en el extremo 3' del gen para facilitar los estudios de caracterización y visualización. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

El ADN transformante se clonó en el vector pPIC9K (Invitrogen), con lo que se introdujo el péptido señal del factor alfa en el extremo 5' para facilitar la secreción, y se introdujo en células GS115 competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para determinar si las lectinas recombinantes se expresaban, 1 l de cada cepa se cultivó y se centrifugó a $5000 \times g$ durante 15 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a $4^{\circ}C$ y en presencia de inhibidores de la proteasa. 1 ml de resina de Ni-NTA (Qiagen) se aplicó a los medios gastados durante 1 hora. La resina se recogió, se lavó con 30 volúmenes de columna de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se eluyó con 5 ml de TBS e imidazol 400 mM a pH 7,5. A continuación, el eluato se concentró hasta una concentración final de 5 mg/ml utilizando Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore). Las lectinas representativas secretadas por *P. pastoris* se etiquetan y se muestran en la figura 10.

Ejemplo 5. Producción de proteínas de fusión de supercóntigo y lectina en *P. pastoris*

Los ácidos nucleicos que codifican las lectinas de *H. pomatia*, *L. culinaris* y *T. vulgaris* se fusionaron a proteínas supercóntigo, tales como Pirla (SEC ID n°: 6; SEC ID n°: 7) de *S. cerevisiae*, Pirlb (SEC ID n°: 8) de *S. cerevisiae*, la floculina Flo1p y la aglutinina Aga1p. Todas las fusiones, excepto las que tienen Flo1p, son una fusión N-terminal de colocación de la lectina 5' del supercóntigo. Una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG se diseñaron en el conector entre los dos genes para facilitar los estudios de caracterización y visualización. El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1B. En este ejemplo, el segmento etiquetado "Transgén 1" es el gen que codifica la lectina de *H. pomatia*. El segmento etiquetado "Transgén 2" es el gen que codifica la lectina de *L. culinaris*. El segmento etiquetado "5'UTR" es el promotor AOX1, el segmento etiquetado "3'UTR" es el terminador AOX1, el segmento etiquetado "Supercóntigo 1" es Pirla, Pirlb o Aga1p, y el segmento etiquetado "Supercóntigo 2" es la Flo1p. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

El ADN transformante se clonó en el vector pPIC9K (Invitrogen), con lo que se introdujo el péptido señal del factor alfa en el extremo 5' para facilitar la secreción, y se introdujo en células GS115 competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las colonias se cribaron para la expresión según las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los datos representativos que

muestran Pir1b-lectina de *H. pomatia* (1), Pir1b-lectina de *L. culinaris* (2) y Pir1a-lectina de *T. vulgaris* (3) a partir de los estudios de expresión se muestran en la figura 11.

Para determinar si la fusión lectina-supercóntigo está correctamente insertada en la membrana plasmática, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 25 ml de un cultivo de $OD_{600} = 1$ a $5000 \times g$ durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a $4^{\circ}C$ y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a $30000 \times g$ durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a $540000 \times g$ en un rotor TLA100.3 (Beckman) durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados de un constructo representativo de fusión, la fusión Pir1a-lectina de *T. vulgaris*, se muestran en la figura 12.

Ejemplo 6. Transformación nuclear de *C. reinhardtii* con un ácido nucleico que codifica un marcador de resistencia fusionado y gen que codifica una proteína de fusión lectina-Fas1.

Un ácido nucleico que codificaba una lectina de *L. culinaris*, *L. culinaris* truncada y *E. cristagalli* fusionada a Fas1 de *C. reinhardtii* se introdujo en *C. reinhardtii* (SEC ID n°: 9, SEC ID n°: 10, SEC ID n°: 11). El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1D. El segmento etiquetado "Transgene" es el gen que codifica lectina-Fas1, el segmento etiquetado "5'UTR" es el 5' UTR de HSP70/rbcS2 de *C. reinhardtii* con intrones, el segmento etiquetado "Selection Marker" es un gen de resistencia a la bleomicina, el segmento etiquetado CM (fracción de escisión) es la proteasa viral 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), el segmento etiquetado "Targeting Signal" es un péptido señal que se dirige a la proteína para la presentación en la superficie celular, el segmento etiquetado "Anchoring Domain" es un dominio de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que une covalentemente la proteína lectina-Fas1 a la superficie de la célula, y el segmento etiquetado "3'UTR" es el 3'UTR de rbcS2 de *C. reinhardtii*. Las regiones de codificación del gen de resistencia a la bleomicina, 2A y lectina-Fas1 están unidos físicamente en el mismo marco de lectura, lo que da lugar a un único ORF quimérico. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG en la unión entre la lectina y Fas1 mediante técnicas estándar. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

Para estos experimentos, todas las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa 21gr de *C. reinhardtii*. Las células se cultivaron y se transformaron mediante electroporación. Las células se cultivaron hasta la fase semilogarítmica (aproximadamente $2-6 \times 10^6$ células/ml). Se añadió Tween-20 a cultivos celulares hasta una concentración del 0,05% antes de la recolección para evitar que las células se adhieran a los tubos de centrifugación. Las células se centrifugaron suavemente (entre 2000 y 5000 $\times g$) durante 5 min. Se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio TAP + sacarosa 40 mM. Se mezclaron de 1 μg a 2 μg de ADN transformante con $\sim 1 \times 10^8$ células sobre hielo y se transfirieron a cubetas de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación con la capacitancia fijada en 25 μF , el voltaje en 800 V para dar un V/cm de 2000 y una constante de tiempo de 10-14 ms. Tras la electroporación, la cubeta se hizo volver a la temperatura ambiente durante 5-20 min. Las células se transfirieron a 10 ml de TAP + sacarosa 40 mM y se dejaron recuperar a temperatura ambiente durante 12-16 horas con agitación continua. A continuación, las células se recolectaron por centrifugación a entre 2000 $\times g$ y 5000 $\times g$ y se resuspendieron en 0,5 ml de medio TAP + sacarosa 40 mM. 0,25 ml de células se sembraron en placas en medio TAP + bleomicina 20 $\mu g/ml$. Todas las transformaciones se llevaron a cabo bajo selección de bleomicina (20 $\mu g/ml$), donde la resistencia la proporcionaba el gen codificado por el segmento de la figura 1D etiquetado "Selection Marker". Las cepas transformadas se mantuvieron en presencia de bleomicina para evitar la pérdida del ADN exógeno.

Las colonias cultivadas en presencia de bleomicina se cribaron mediante transferencia puntual. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición a las proteínas, las bolas se lavaron tres veces con 150 μl de 1X solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBST) a temperatura ambiente. Las proteínas fueron liberadas de las bolas mediante 150 μl de EDTA 20 μM , Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 400 mM, y los 150 μl de eluidos se sometieron a transferencia puntual sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West

Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Las colonias que mostraron resultados positivos en el análisis de transferencia puntual se cribaron por transferencia Western.

Las zonas de células de alga cultivadas sobre placas de TAP con agar se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 μ l de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados de tres cepas se muestran en la figura 13.

Para determinar si la fusión lectina-Fas1 estaba correctamente insertada en la membrana plasmática en una orientación en la que la lectina se presenta externamente, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 100 ml de un cultivo con un mínimo de 1×10^7 células/ml a 5000 x g durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a 4°C y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a 540000 x g en un rotor TLA 100.3 (Beckman) durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados de varios constructos de fusión se muestran en la figura 14. Como era de esperar por el modo de anclaje a la membrana, sigue existiendo una cantidad significativa de proteína en la fracción citosólica/soluble. Sin embargo, también hay proteína en la fracción de membrana. En la figura 15 se puede observar el efecto de la presencia del constructo de proteína de fusión Fas1-lectina de *E. cristagalli* en la sedimentación.

Ejemplo 7. Transformación nuclear de *C. reinhardtii* con un ácido nucleico que codifica un marcador de resistencia fusionado y gen que codifica una proteína de fusión lectina-GP1.

Un ácido nucleico que codificaba una lectina de *H. pomatia* y *L. culinaris* fusionada a GP1 de *C. reinhardtii* se introdujo en *C. reinhardtii* (SEC ID n°: 12, SEC ID n°: 13). El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1E. El segmento etiquetado "Transgene" es el gen que codifica lectina-GP1, el segmento etiquetado "Promoter/5'UTR" es el 5' UTR de HSP70/rbcS2 de *C. reinhardtii* con intrones, el segmento etiquetado "Selectable Marker" es un gen de resistencia a la bleomicina, el segmento etiquetado CM (fracción de escisión) es la proteasa viral 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), el segmento etiquetado "Targeting Signal" es un péptido señal que se dirige a la proteína para la presentación en la superficie celular, el segmento etiquetado "Anchoring Domain" es un dominio de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que une covalentemente la proteína lectina-Fas1 a la superficie de la célula, y el segmento etiquetado "3'UTR" es el 3'UTR de rbcS2 de *C. reinhardtii*. Las regiones de codificación del gen de resistencia a la bleomicina, 2A y lectina-GP1 están unidos físicamente en el mismo marco de lectura, lo que da lugar a un único ORF quimérico. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epitopo FLAG en la unión entre la lectina y GP1 mediante técnicas estándar. Otro epitopo FLAG está codificado en el extremo 3' del transgén. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

Para estos experimentos, todas las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa 21gr de *C. reinhardtii*. Las células se cultivaron y se transformaron mediante electroporación. Las células se cultivaron hasta la fase semilogarítmica (aproximadamente $2-6 \times 10^6$ células/ml). Se añadió Tween-20 a cultivos celulares hasta una concentración del 0,05% antes de la recolección para evitar que las células se adhirieran a los tubos de centrifugación. Las células se centrifugaron suavemente (entre 2000 y 5000 x g) durante 5 min. Se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio TAP + sacarosa 40 mM. Se mezclaron de 1 μ g a 2 μ g de ADN transformante con $\sim 1 \times 10^9$ células sobre hielo y se transfirieron a cubetas de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación con la capacitancia fijada en 25 μ F, el voltaje en 800 V para dar un V/cm de 2000 y una constante de tiempo de 10-14 ms. Tras la electroporación, la cubeta se hizo volver a la temperatura ambiente durante 5-20 min. Las células se transfirieron a 10 ml de TAP + sacarosa 40 mM y se dejaron recuperar a temperatura ambiente durante 12-16 horas con agitación continua. A continuación, las células se recolectaron por centrifugación a entre 2000 x g y 5000 x g y se resuspendieron en 0,5 ml de medio TAP + sacarosa 40 mM. 0,25 ml de células se

sembraron en placas en medio TAP + bleomicina 20 µg/ml. Todas las transformaciones se llevaron a cabo bajo selección de bleomicina (20 µg/ml), donde la resistencia la proporcionaba el gen codificado por el segmento de la figura 1E etiquetado "Selection Marker". Las cepas transformadas se mantuvieron en presencia de bleomicina para evitar la pérdida del ADN exógeno.

5 Las colonias cultivadas en presencia de bleomicina se cribaron mediante transferencia puntual. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición a las proteínas, las bolas se lavaron tres veces con 150 µl de 1X solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBST) a temperatura ambiente. Las proteínas fueron liberadas de las bolas mediante 150 µl de EDTA 10 µM, Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 400 mM, y los 150 µl de eluidos se sometieron a transferencia puntual sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Las colonias que mostraron resultados positivos en el análisis de transferencia puntual se cribaron por transferencia Western.

20 Las zonas de células de alga cultivadas sobre placas de TAP con agar se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poli(acrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Una pequeña cantidad de fusión intacta (marcador de resistencia a la bleomicina fusionado con GP1-lectina) es traducida por las células; como el marcador de resistencia forma un dímero, estos productos migran a un peso molecular más alto. La figura 16 indica que se produjeron fusiones GP1-lectina que comprendían lectinas de *H. pomatia* y *L. culinaris* en *C. reinhardtii*.

35 Para determinar si las fusiones lectina-GP1 estaban correctamente insertadas en la membrana plasmática en una orientación en la que la lectina se presenta externamente, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 100 ml de un cultivo con un mínimo de 1×10^7 células/ml a 5000 x g durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a 4°C y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y urea 2M y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a 540000 x g en un rotor TLA100.3 (Beckman) durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poli(acrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) en presencia de urea 2M y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Los resultados mostrados en la figura 17 demuestran la presencia de GP1-lectina de *H. pomatia* en la fracción de membrana. En la figura 18 se puede observar el efecto de la presencia del constructo GP1-lectina de *H. pomatia* en la sedimentación.

50 **Ejemplo 8. Transformación nuclear de *C. reinhardtii* con un ácido nucleico que codifica un marcador de resistencia fusionado y gen que codifica una proteína de fusión Fas1-scFv.**

55 Un ácido nucleico que codificaba un anticuerpo/fragmento variable monocatenario (scFv5) fusionado a Fas1 se introdujo en *C. reinhardtii* (SEC ID nº: 14). El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1D. El segmento etiquetado "Transgene" es el gen que codifica scFv5-Fas1, el segmento etiquetado "Promoter/5'UTR" es el 5' UTR de HSP70/rbcS2 de *C. reinhardtii* con intrones, el segmento etiquetado "Selectable Marker" es un gen de resistencia a la bleomicina, el segmento etiquetado CM (fracción de escisión) es la proteasa viral 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), el segmento etiquetado "Targeting Signal" es un péptido señal que se dirige a la proteína para la presentación en la superficie celular, el segmento etiquetado "Anchoring Domain" es un dominio de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que une covalentemente la proteína scFv-Fas1 a la superficie de la célula, y el segmento etiquetado "3'UTR" es el 3'UTR de rbcS2 de *C. reinhardtii*. Las regiones de codificación del gen de resistencia a la bleomicina, 2A y lectina-Fas1 están unidos físicamente en el mismo marco de lectura, lo que da lugar a un único ORF quimérico. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG en la unión entre scFv5 y Fas1 mediante técnicas estándar. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se

llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

5 Para estos experimentos, todas las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa 21gr de *C. reinhardtii*. Las células se cultivaron y se transformaron mediante electroporación. Las células se cultivaron hasta la fase semilogarítmica (aproximadamente $2-6 \times 10^6$ células/ml). Se añadió Tween-20 a cultivos celulares hasta una concentración del 0,05% antes de la recolección para evitar que las células se adhirieran a los tubos de centrifugación. Las células se centrifugaron suavemente (entre 2000 y 5000 x g) durante 5 min. Se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio TAP + sacarosa 40 mM. Se mezclaron de 1 µg a 2 µg de ADN transformante con $\sim 1 \times 10^8$ células sobre hielo y se transfirieron a cubetas de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación con la capacitancia fijada en 25 µF, el voltaje en 800 V para dar un V/cm de 2000 y una constante de tiempo de 10-14 ms. Tras la electroporación, la cubeta se hizo volver a la temperatura ambiente durante 5-20 min. Las células se transfirieron a 10 ml de TAP + sacarosa 40 mM y se dejaron recuperar a temperatura ambiente durante 12-16 horas con agitación continua. A continuación, las células se recolectaron por centrifugación a entre 2000 x g y 5000 x g y se resuspendieron en 0,5 ml de medio TAP + sacarosa 40 mM. 0,25 ml de células se sembraron en placas en medio TAP + bleomicina 20 µg/ml. Todas las transformaciones se llevaron a cabo bajo selección de bleomicina (20 µg/ml), donde la resistencia la proporcionaba el gen codificado por el segmento de la figura 1D etiquetado "Selection Marker". Las cepas transformadas se mantuvieron en presencia de bleomicina para evitar la pérdida del ADN exógeno.

20 Las colonias cultivadas en presencia de bleomicina se cribaron mediante transferencia puntual. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición a las proteínas, las bolas se lavaron tres veces con 150 µl de 1X solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBST) a temperatura ambiente. Las proteínas fueron liberadas de las bolas mediante 150 µl de EDTA 10 µM, Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 400 mM, y los 150 µl de eluidos se sometieron a transferencia puntual sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Las colonias que mostraron resultados positivos en el análisis de transferencia puntual se cribaron por transferencia Western.

35 Las zonas de células de alga cultivadas sobre placas de TAP con agar se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). En la figura 19 se muestran los resultados de la colonia (y el control de tipo natural). Una pequeña cantidad de fusión intacta (marcador de resistencia a la bleomicina fusionado con scFv5-Fas1) es traducida por las células; como el marcador de resistencia forma un dímero, estos productos migran a un peso molecular más alto. Los resultados indican que la proteína de fusión scFv-Fas1 estaba siendo producida a partir de las cepas.

50 Para determinar si la fusión scFv5-Fas1 estaba correctamente insertada en la membrana plasmática en una orientación en la que se presenta externamente, se realizaron aislamientos de la membrana. Se centrifugaron 100 ml de un cultivo con un mínimo de 1×10^7 células/ml a 5000 x g durante 10 minutos. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron a 4°C y en presencia de inhibidores de la proteasa. Los gránulos se resuspendieron en 3 ml de 1x solución salina tamponada con Tris (TBS) y se sonicó a una potencia del 30% usando una macroaguja durante 3 ciclos de 10 segundos. A continuación, la solución se centrifugó a 30000 x g durante 30 minutos para eliminar las células no lisadas. 1 ml del sobrenadante (mezcla de membranas y proteínas citosólicas) se extrajo con cuidado y se centrifugó a 540000 x g en un rotor TLA 100.3 durante 20 minutos para separar las sustancias insolubles (membranas) de las solubles (proteínas citosólicas). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). En la figura 20 se muestran los resultados de un aislamiento de membrana de scFv-Fas1.

Ejemplo 9. Expresión inducible por nitrato de una fracción de floculación en *C. reinhardtii*.

En este ejemplo, se introdujo un ácido nucleico que codificaba una lectina de *H. pomatia* en *C. reinhardtii* (SEC ID nº: 15). El ADN transformante se muestra gráficamente en la figura 1F. El segmento etiquetado "Transgene" es un gen que codifica lectina, el segmento etiquetado "5'UTR" es la nitrato reductasa 5' UTR de *C. reinhardtii*, el segmento etiquetado "Selectable Marker" es el gen de la nitrato reductasa, el segmento etiquetado "CM" (fracción de escisión) es la proteasa viral 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV) y el segmento etiquetado 3'UTR es el 3'UTR de la nitrato reductasa de *C. reinhardtii*. Las regiones de codificación de nitrato reductasa, 2A y lectina de *H. pomatia* están unidas físicamente en el mismo marco de lectura, lo que da lugar a un único ORF quimérico. Se diseñaron una etiqueta de afinidad de metales (MAT), un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y un epítipo FLAG en el extremo 3' de la lectina mediante técnicas estándar. Todas las manipulaciones de ADN realizadas en la construcción de este ADN transformante se llevaron a cabo esencialmente tal como se describe en Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) y Cohen *et al*, Meth. Enzymol. 297, 192-208, 1998.

Para estos experimentos, todas las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa Nit1-305 de *C. reinhardtii*, deficiente en nitrato reductasa funcional, procedente del centro de investigación de *Chlamydomonas*. Las células se cultivaron y se transformaron mediante electroporación. Las células se cultivaron hasta la fase semilogarítmica (aproximadamente $2-6 \times 10^6$ células/ml). Se añadió Tween-20 a cultivos celulares hasta una concentración del 0,05% antes de la recolección para evitar que las células se adhirieran a los tubos de centrifugación. Las células se centrifugaron suavemente (entre 2000 y 5000 x g) durante 5 min. Se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio TAP + sacarosa 40 mM. Se mezclaron de 1 µg a 2 µg de ADN transformante con $\sim 1 \times 10^8$ células sobre hielo y se transfirieron a cubetas de electroporación. Se llevó a cabo la electroporación con la capacitancia fijada en 25 µF, el voltaje en 800 V para dar un V/cm de 2000 y una constante de tiempo de 10-14 ms. Tras la electroporación, la cubeta se hizo volver a la temperatura ambiente durante 5-20 min. Las células se transfirieron a 10 ml de TAP + sacarosa 40 mM y se dejaron recuperar a temperatura ambiente durante 12-16 horas con agitación continua. A continuación, las células se recolectaron por centrifugación a entre 2000 x g y 5000 x g y se resuspendieron en 0,5 ml de medio TAP + sacarosa 40 mM. Se sembraron en placas 0,25 ml de células con medio TAP - NH₄Cl + KNO₃ 7,4 mM. Todas las transformaciones se llevaron a cabo en presencia de KNO₃ 7,4 mM, donde la capacidad de utilizar el NO₃ como única fuente de nitrógeno es proporcionada por la nitrato reductasa. Las cepas transformadas se mantuvieron en presencia de KNO₃ para evitar la pérdida del ADN exógeno.

Las colonias cultivadas en TAP - NH₄Cl + KNO₃ 7,4 mM se cribaron por transferencia puntual. En resumen, las colonias se lisaron mediante el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición a las proteínas, las bolas se lavaron tres veces con 150 µl de 1X solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBST) a temperatura ambiente. Las proteínas fueron liberadas de las bolas mediante 150 µl de EDTA 20 µM, Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 400 mM, y los 150 µl de eluidos se sometieron a transferencia puntual sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). Las colonias que mostraron resultados positivos en el análisis de transferencia puntual se cribaron por transferencia Western.

Las zonas de células de alga cultivadas sobre placas de TAP con agar se lisaron mediante resuspensión de las células en 50 µl de tampón de muestra 1X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semiseco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech).

A fin de caracterizar la capacidad de inducción de la expresión, se cultivaron 50 ml de la cepa Nit-2A-lectina de *H. pomatia* en medio TAP con luz. Cuando la densidad del cultivo celular alcanzó el valor 1×10^6 células/ml, el cultivo se dividió en dos muestras de 25 mL. Cada una se centrifugó a 5000 x g durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y una muestra se resuspendió en 25 ml de TAP. La otra muestra se resuspendió en 25 ml de TAP - NH₄Cl + KNO₃ 7,4 mM. Se centrifugaron 20×10^6 células y se congelaron en los instantes 0, 12 horas y 24 horas. Estas muestras se procesaron y las proteínas etiquetadas con MAT se separaron utilizando de partículas de Ni MagneHis (Promega) según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición a las proteínas, las bolas se lavaron tres veces con 150 µl de 1X solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05% (TBST) a temperatura ambiente. Las proteínas se liberaron de las bolas mediante 150 µl de EDTA 20 µM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, NaCl 400 mM. Se añadieron 50 µl de tampón de muestra 4X SDS con agente reductor (BioRad). A continuación, las muestras se hirvieron y se hicieron pasar a través de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (BioRad) y se

transfirieron a membranas de PVDF utilizando un papel secante semisecco Trans-blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon por tampón de bloqueo Starting Block (TBS) (Thermo Scientific) y se sondaron durante una hora con conjugado de anticuerpo anti-FLAG de ratón y peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluido a razón de 1:3000 en tampón Starting Block. Tras el sondeo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBST, se revelaron con sustrato quimioluminiscente Supersignal West Dura (Thermo Scientific) y se tomaron imágenes utilizando una cámara CCD (Alpha Innotech). La inducción de la expresión de lectina de *H. pomatia* es muy significativa, tal como se muestra en la figura 21.

Ejemplo 10. Floculación inducida por privación de nitrógeno y mediada por fenotipo de apareamiento de *Chlamydomonas reinhardtii*

En este ejemplo, las dos cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 21gr y 6145c, que representan los dos tipos de apareamiento más (MT+) y menos (MT-), respectivamente, se cultivaron en medios tris-acetato-fosfato (TAP) hasta 5×10^6 células/ml. Se centrifugó 1 l de cada cultivo a 5000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se extrajo y los gránulos se resuspendieron en 1 l de medio TAP sin cloruro de amonio (TAP - NH₄Cl). El cultivo se centrifugó de nuevo para lavar el cloruro de amonio residual a 5000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se extrajo y los gránulos se resuspendieron en 1 l de medio TAP - NH₄Cl. El cultivo se centrifugó de nuevo a 5000 x g durante 10 minutos. Los gránulos se resuspendieron en 1 l de TAP - NH₄Cl y se agitaron durante 12-16 horas con luz. Los cultivos se combinaron en una proporción de 1:1 y se agitaron durante 12 horas con luz antes de observar la sedimentación. Se observó la sedimentación o decantación de 7,5 ml del cultivo en tubos de cultivo desechables de borosilicato de 13 x 100 mm en función del tiempo. Los resultados se muestran en la figura 22.

Una variación del método comprende minimizar la cantidad de nitrógeno en los medios para que el cultivo inicie de forma natural la inanición a medida que se aproxima a la saturación. Se cultivaron las cepas 21gr y 6145c en TAP hasta aproximadamente $2-6 \times 10^6$ células/ml. Se centrifugaron aproximadamente 1×10^8 células y se resuspendieron en 1 ml de TAP - NH₄Cl. Se diluyeron en un factor de 10000 en TAP - NH₄Cl + NaNO₃ 5 mM. La saturación se alcanzó tras tres días de crecimiento con luz. Se observó la sedimentación de 7,5 ml del cultivo en tubos de cultivo desechables de borosilicato de 13 x 100 mm en función del tiempo. Los resultados se muestran en la figura 23.

Tabla 1. Datos de secuencia

SEC ID nº	Secuencia génica sintetizada, con sesgo de codones	Descripción de la secuencia
1	atgacatgtagaattccctaggctcgagcagtcgcccgaagaccatgcttcagcgcgccatcgaccgagcaga cgtttagacccaacaggctgctcatctacgacatcgtgattacgaaaccagcgaaccgctacgataactccaccgacct gttaccgctcgccggtagcagcgaatgacgcttcaactgacgaitaaggagaaggaggctgggtgga gctcgtgacacaacggctcgaaggtgagcgtctacgcaagcaggacagcagctacgaitctgctgagcaactcgg catcatcaagatgaaggagggtgacgggtgaaactgctgggcccacaagaagctgggtctgctggccgacgacg agctgtacaacagcttctcggccacttctgctggcctggcaccggcaccgggactacaaggagcagcagcaga agctcggcgagaactgctacttccaggccacaaccgcccacaagcacaaccgggtgctgactgag atgacatgtagaattccctaggctcgagcaaccggtgcccgggagcaggggctcaacatgtaggctcccaacaacctgct tgcctcagctacgggtactgctggcctggggcgaactactgctggcaaggctgccaagaacggcctgctgagacct caagcgtcggcttccaggccgggtggcctcctgctcacaacaaccagtgctgctccagtagtgcctactgctggctt cggcgcggagactgctggctgggctccaaggggcccccctcggcgtgacatcaagtgctggctgacggctggc ggcaagctgctggcccgaacaacctctgctgcaagcagtggggcttctgctggctggcagcaggttgggggtgggtt ggcagagcggcgcctgacgacggacaagccgtgctggcaaggagctggcggccggctgctcaactaactattg ctgctcaagtgggctcctgctggcctcggcctggcctgcttctggctggcggcctggcagctggcggctgcaagcgg gctactggcaccgtgactacaaggacgacgacagaagctggcgagaacctgacttcaactcagggtcacaaccaccgc cacaagcacaaccgggtgctgactga	Lectina de <i>H. pomatia</i>
2	atgacatgtagaattccctaggctcgagcaaccggtgcccgggagcaggggctcaacatgtaggctcccaacaacctgct tgcctcagctacgggtactgctggcctggggcgaactactgctggcaaggctgccaagaacggcctgctgagacct caagcgtcggcttccaggccgggtggcctcctgctcacaacaaccagtgctgctccagtagtgcctactgctggctt cggcgcggagactgctggctgggctccaaggggcccccctcggcgtgacatcaagtgctggctgacggctggc ggcaagctgctggcccgaacaacctctgctgcaagcagtggggcttctgctggctggcagcaggttgggggtgggtt ggcagagcggcgcctgacgacggacaagccgtgctggcaaggagctggcggccggctgctcaactaactattg ctgctcaagtgggctcctgctggcctcggcctggcctgcttctggctggcggcctggcagctggcggctgcaagcgg gctactggcaccgtgactacaaggacgacgacagaagctggcgagaacctgacttcaactcagggtcacaaccaccgc cacaagcacaaccgggtgctgactga	Lectina de <i>T. vulgaris</i>
3	tggcttctgactcccgcgaatataatgactcactataggggaattgtagcgggataacaattccccttagaataattt gttaactttaagaggagatatacatatgacatgtaattcaatgaaagctactaaactgtagtgcggcggtaactcgg gttactactgctggcagggtgtccagcaacgtaaaatcgaatcagggaaattccaggcaaccctgtagtggcttgaat gggttaccgactgcttaggtcgtatgcccgtacaaggcagcgttgaaaacggctgacatacaagctcagggcgttcaactg accgctaaactgggttaccaatcactgacgacctagacatctacatcgtctgggtgtagtggtagtggcgtgcaacact aaatcaaacgtttagttaaaccacgacaccggcgttctcggcttctgctggcgggtgtagtgcgactcactcct gaaatcgtactccgctggaataccagtggaaccaacaactcggtagcacaacacctggcactcgtccggacaac ggatataactcagcagcgtgctggcgtatccgctgctcgcctcgcagctggagcggagcccttccgttctgctgtaacg ggcactacaagtagatgacgacaagctggcgagaacctctattccagggtcacaaccaccgccacaagcacccta ggctcagatgctgcttggctactatattccctggctgctggctattgctgacggccagctgcccctgaaagacatgct ttcagcgcgccatcgaccgagcagacgtttagcgcacaaccagggtgctcactacgacatcgtgattacgaaccacg gcaaccgctacgalaactcaccggcctgttaccgctggctggcagcggcctgtagcagcttcaactgaaacctgctc gattaaaggaaaggagggctgctggagctcgtgcaaacggctcagctcaagggtgagcgtctacggcaagcagacg agcagctacgattcgtcgagcaactcggctcatcalcaagatgaaggagggtgactgggtgaaactgctggggcccacaag aagtgctgcttctggcggcgaagcagagctgtaacaacgttctcggcacttctgctggcctggcggcaccggca ccgggtgctgactgag	Lectina de LppOmpA- <i>H. pomatia</i>
4	atgacatgtagaattccctaggctcgagcaaccggtgcccgggagcaggggctcaacatgtaggctcccaacaacctgct gcaaccgtcaaaaicgatcagggaaatccagcaaccctgattggttgaatgggtacgactggttaggtcgtatgctc cgtaacaaggcagcgttgaaaacggctgatacaaaagctcaggcgttcaactgaccgctaaactggttaccacac tgacagcttagacatctacatcgtctgggtgtagtggctgtagcagactaaatccaacgttatggttaaaaacca cgacaccggcttctcggctctcgtggcgtgtagtgcgactcactcgaatcgtaccctcgtggaatacca gtggacaacaacatcgtgacgcacacacatcggcactctgctggacaaccggatataactgagcagcggctcctgg cgtatccgctgctggcctgcaactggagcagcccttctgctggctagcaggcactcaaggatgtagcagaca cggcggcagagaacctctattccagggtcacaaccaccgccaagcaacctgagctcagagtgactcctcactacagct aacgagggtgctggcctgaaagcagctggctcggagctggctggcagctggctcagcggcaccacggcggcctgagtt cggcccaccagagtgactcctgcttctcagcagcagctggctggcaccagcagctcggcaccggcaccggctg tgcactga	Lectina de LppOmpA-truncada <i>L. culinaris</i>

SEC ID nº	Secuencia génica sintetizada, con sesgo de codones	Descripción de la secuencia
10	<p>atggccaagtctgaccagcgcggttccgggtctaccgcgcgcgacgtccggagcggcggcagttctggaccgaccg gctcgggttcccccgggacttctgtagggagacacttccgggtgtggtccgggagcagcgtgaccctgttcatcagcgcg gtccagggaccaggtgagtcgacgagcaagcccggcggatcagggcagcgtgcttgcagattgacttgcacagcccgc attgtgtcagcgaagcctttggcctctgtctgtctcaagcagcatcaaccctgctccggtttcatttgcaggac caggttggcgggacaacaccctggccttgggttgggtgctggcgccttggagcagcgttaccggagttcggaggt cgtgtccagcaacttccgggacgcctccggccggccatgaccgagatcggcgaagcagccgttgggggggagttc gcccctggcggaccggcggcaactgctgctcacttctgtggccgagggagcaggacgccccgggtagaagcagaccctga acttccagcttctgaagcttggcggcagcttgggagcaaccgggccccctgacatggcgtctcaagccggcc cagagcgttccagcgttggcactgcaagcggaccggcctcagcactcaagagcagcagcagcagcaagctccg gcttcagggtgacttctacacgtgaacgaggtggtccgtgagggagcttgggtccgaggtgggtgctggaltcggct tcagcgcaccacgggctgagttcggccacaggggtgcaactccttgccttccacagcagcgtgggttggcaccga cagctccggcagcgggacccgggtgactataaggaagcagcagcaagctccgggtgagaaacctgactttcaggccac aacaccggccacaagcaccgggtgctgacttcttttaccctcagccctcaactgagcggccttgaacgttca acgtaccgggaggaacatcagcttattcggccacagtgatcagggttgggttctgacgtagcgggggcttctgattat caactccctgcaaccctccactgaccccaactacgacctacacccalacggccaccaggaagggcctcactagcgc gctgctcggccttgaacctgaatcagctccagctgggtgactaacgcaagctgctcagcggcagcagcagcagcagc cttctgtgccaagcacaacacgctctgtccctccgggaattctactacaacgcttgaagtgaggcggggggcgc gagtttagaaggtgacctggatgcccacacggctcgttgcagcttttcatgttggtagtactcaatgttaggccc aaaacccgcgcaactgcccacactacagcagcaggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc lgtcggggcgggttgcgggctcactccctggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agagcgcgttggc cgggtcggc ccgctgctcaccctcaactatctctclagacatgtgctcattgttgcctgacaaaggctccagcggtagtgcagctc gtggagcgggttcttccctgttccctgctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctcagc cagaaacccaacgggcaaggcgcctgctcggcctcctcagcagcacaacatagcgcagcagcagcagcagcagcagc cgacctacatgaggcagc acctctgcccggcagc gttggagc gtttagc ggcctgaccggcttggatgcccagcggcctctacgctgaccttccctcgttggctccctcctcgttgcacagcgc ccttaccggc tccactctgtctgaccacgtctgcccggcctgtacaacgctcctcgttttccaccacacccatcagctcaccacctg acgtatggcttctg ctg agctgagctgttggtaggagcggcacttctgctgttggtaggagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ggc ggc taccagcttccaacctgtcagggcagcttccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc tccgttggctcggc ggctgctgctcaacaggtgacttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ctgcttccatttgcacttaccgaaaggactgacttaccccaagtgttcccttggcttggctgctgctgctgctgctgctg cagcaccacatcaccggcagcgttctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc cagcggc</p>	Lectina de -Fas1L. <i>culinaris</i> truncada
	<p>ccctcagggccacagacctctatgacagccagcgtgctgaccttgggtgtcttggcgtgttccagggcagcagctggctc ggggctgggtgctgacgggtggcggcctcaccacggccagaaattaccaccaggttggggcagtagcattgggctt gagggttcccacattgggtggttggcggcgttggcttctatgctgagtagaalgctatgcttggcttggctt ggcttgcattatgcttctgctgagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ctgggcaacagcgtgctcagcgttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc ccaccttctcagcggctgagtgcttcttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc cggc catctcctcagcgggtgtctgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc caaciacggcggccttctgctcagctgttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc</p>	

ES 2 475 973 T3

atgacatgtg aattccctag gctcgagcag tgcgccctga agaccattgc tttcagcgcc	60
gccatcgacc gcgagcagac gtttgacgcc aaccaggtgg tcacttacga catcgtgatt	120
acgaaccacg gcaacgccta cgataactcc accggcctgt tcaccgcgcc ggtggacggc	180
atgtacagct ttcaactgaa cctgctcacg attaaggaga aggagggctg gctggagctc	240
gtgcacaacg gtcagctcaa ggtgagcgtc tacgcgaagc aggacagcac gtacgattcg	300
tcgagcaact cggatcatcat caagatgaag gaggggtgatc gggatgaacgt gcgggcccac	360
aagaagtccg gtctgttcgg ccgcgacgac gagctgtaca acacgttctc cggccaacttc	420
ctgtccggcc tgggcaccgg caccgggtgac tacaaggacg acgacgaaa gtccggcgag	480
aacctgtact tccaggcca caaccaccgc cacaagcaca ccggtgtcga ctag	534

<210> 2
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> lectina de T. vulgaris con sesgo de codones

10

<400> 2

atgacatgtg aattccctag gctcgagcaa cggatcgggg agcaggggtc caacatggag	60
tgccccaaaca acctgtgctg ctgcagctac gggactgctg gcattggcgg cgactactgc	120
ggcaagggtc gccagaacgg cgctgctgg acctccaagc gctgcgggtc ccaggccggt	180
ggcgccacct gcaccaaaaa ccagtctctc tcccagtatg gctactgcgg ctccggcgcg	240
gagtactgctg gtgcgggctg ccaggggcgc ccctgccgct ctgacatcaa gtgcgggtctg	300
caggctggcg gcaagctgtg cccgaacaac ctctgctgca gccagtgggg ctctctcggt	360
ctgggcagcg agllllgcgg tgggtglltc cagagcggcg cclgcagcac ggacaagccg	420
tgcggaagg acgctggcgg ccgggtctgc actaacaact attgctgctc caagtggggc	480
tcctgcgcea tcggcccggg ctattgcggt gcgggctgcc agtcggggcg ctgcgacggc	540
ggcactggca ccggtgacta caaggacgac gacgacaagt cgggcgagaa cctgtacttc	600
cagggtcaca accaccgcca caagcacacc ggtgtcgact ga	642

15

<210> 3
 <211> 1211
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Fusión LppOmpA-lectina de H. pomatia

25

<400> 3

ES 2 475 973 T3

```

ttggttctcg atcccgcgaa attaatacga ctactatag gggaattgtg agcggataac      60
aattcccctc tagaaataat tttgtttaac ttaagaagg agatatacat atgacatgtg      120
aattcatgaa agctactaaa ctggtactgg ggcgggtaat cctgggttct actctgctgg      180
caggttgctc cagcaacgct aaaatcgatc agggaattcc aggcaaccgc tatgttggct      240
ttgaaatggg ttacgactgg ttaggtcgta tgccgtacaa aggcagcgtt gaaaacggtg      300
catacaaagc tcagggcggt caactgaccg ctaaactggg ttaccaatc actgacgacc      360
tagacatcta cactcgtctg ggtggtatgg tatggcgtgc agacactaaa tccaacgttt      420
atggtaaaaa ccacgacacc ggcgtttctc cggctctcgc tggcgggtgt gagtacgcga      480
tcaactctga aatcgctacc cgtctggaat accagtggaac caacaacatc ggtgacgcac      540
acaccatcgg cactcgtccg gacaacggta ttaactcgag cagcgtgcct ggcgatccgc      600
gcgtgcctcg cagctggacg gagcccttcc cgttctgcgg tacagggcgc tacaaggatg      660
atgacgacaa gtcgggcgag aacctctatt tccaggtca caaccaccgc cacaagcacc      720
ctaggctcga gatgctgttt gtcactatta tttccctggg tctgctggct attgtgcacg      780
gccagtgcgc cctgaagacc attgctttca ggcgcccat cgaccgcgag cagacgtttg      840
acgccaaacca ggtggtcacc tacgacatcg tgattacgaa ccacggcaac gcctacgata      900
actccaccgg cctgttcacc gcgcgggtgg acggcatgta cagcttcaa ctgaacctgc      960
tcacgattaa ggagaaggag ggctggctgg agctcgtgca caacggtcag ctcaagggtga    1020
gcgtctacgc gaagcaggac agcacgtacg attcgtcgag caactcggtc atcatcaaga    1080
tgaaggaggg tgatcgggtg aacgtgcggg cccacaagaa gtcgggtctg ttcggccgcg    1140
acgacgagct gtacaacacg ttctcggcc acttctgtc cggcctgggc accggcaccg    1200
gtgtcgacta g                                     1211

```

5 <210> 4
 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Fusión LppOmpA-lectina truncada de L. culinaris

<400> 4

ES 2 475 973 T3

atgacatgtg aattcatgaa agctactaaa ctggtactgg gcgcggtaat cctgggttct	60
actctgctgg caggttgcct cagcaacgct aaaatcgatc agggaattcc aggcaaccgg	120
tatgttgctt ttgaaatggg ttacgactgg ttaggtcgta tgccgtacaa aggcagcgtt	180
gaaaacggtg catacaaacg tcagggcggt caactgaccg ctaaactggg ttaccaatc	240
actgacgacc tagacatcta cactcgtctg ggtgggatgg tatggcgtgc agacactaaa	300
tccaacgttt atggtaaaaa ccacgacacc ggcgtttctc cgtctctgc tgccgggtgtt	360
gagtacgca tcactcctga aatcgctacc cgtctggaat accagtggac caacaacatc	420
ggtgacgcac acaccatcgg cactcgtccg gacaacggta ttaactcgag cagcgtgcct	480
ggcgatccgc gcgtgcctcg cagctggacg gagcccttc cgtctcgcgg tacaggcgac	540
tacaaggatg atgacgacaa gtcgggagag aacctctatt tccagggtca caaccaccgc	600
cacaagcacc ctaggctcga ggtgacttcc tacacgctga acgaggtggt gccgctgaag	660
gacgtggtgc ccgagtgggt gcggatcggc ttcagcgcca ccacgggcgc tgagtccgc	720
gcccacgagg tgcactcctg gtcctttcac agcagagctgg gtggcaccag cagctccggc	780
acgggcaccg gtgtcgactg a	801

5

<210> 5
 <211> 1962
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Fusión lectina de L. culinaris -beta-Autotransportador
 <400> 5

atgacatgtg aattccctag gctcgagact gagactacgt cgtttagcat taccaagttt	60
tcccctgatc agcagaacct gatcttcag ggcgacggct acaccacgaa gggcaagctg	120
acctgacga aggcgctcaa gagcactgtg ggccgggcgc tqtatagcac cccattcac	180

ES 2 475 973 T3

```

atttgggacc gcgacaccgg gaacgtggcc aacttcgtga cctccttcaac cttcgtgate 240
gacgceccca gctcgtacaa cgtggcggac ggottcacct tcttcacogc gcctgtggac 300
acgaagccgc agacggggcg cgggtatctg ggcgtettca actcgaagga gtacgacaag 360
acttcgcaga ccgtggccgt ggagttcogat actttctaca acgcggcctg ggaccccagc 420
aacaaggagc gccacattgg catcgacgtg aactcgateca agtcgggtgc caccaagagc 480
tggaacctgc agaacggcga gcgcgcgaac gtggtcacog cgttcaacgc cgccacgaac 540
gtcctgaccg tcacctgac ctacctacc ggtgtcgaog attacaagga tgatgatgac 600
aagagcggcg agaacctgta cttccagggg cacaaccatc gccacaagca cggcatcaac 660
aqctcqaqcg tqcccgcgga ccgcgcogtg cctcogtcoq qgaccgagcc gttccccttc 720
tgcggtacag gcgtattttc attggatgat tatgatgcaa aagacaatag tgaatcatca 780
ataggttaatt tagctcgtgt aatacctaga atgggaaggg agttaattaa tgattatgaa 840
gaaatccctt tggaggagtt ggaagatgaa gcggaagaag aacgtcgcga agcaacgcaa 900
ttccactcca aaagtcgtaa ccgtagagct atatcatcgg aacctatcgc tgatgaagat 960
gcatctgaat cggtttccac atcagacaaa caccctcaag ataatacggg acttcatgaa 1020
aaagttgaga cggcggggtt acaaccaaga gccgcgcagc cgcgaaccca agccgcggcg 1080
caagccgatg cagtcagcac caatactaac tcggctttat ctgacgcaat ggcaagcacg 1140
caatctatct tgtttgatac aggtgcttac ttaacacggc acattgcaca aaaatcacgc 1200
gctgatgccg aaaaaaacag tgtttggatg tcaaacactg gttatggccg tgattatgct 1260
tccgcacaat atcgcoggtt tagttcgaaa cgcacgcaa cacaatcgg cattgaccgc 1320
agcttgccg aaaaatgca gataggcgga gtattgactt actctgacag tcagcatact 1380
tttgatcagc cgggcggcaa aaatactttt gtgcaagcca acctttatgg taagtattat 1440
ttaaatgatg cttggtatgt ggccggcgat attggtgcgg gcagcttgag aagccggtta 1500
caaacgcagc aaaaagcaaa ctttaaccga acaagcatcc aaaccggcct tactttgggc 1560
aatacgtga aatcaatca attcgagatt gtccctaqtg cgggtatccg ttacagccgc 1620
ctgtcatctg cagattacaa gttgggtgac gacagtgtta aagtaagttc tatggcagtg 1680
aaaacactaa cggccggact ggattttgct tatcggttta aagtcggcaa ccttaccgta 1740
aaacccttgt tatctgcagc ttactttgcc aattatggca aaggcggcgt gaatgtgggc 1800
ggtaaatcct tcgcctataa agcagataat caacagcaat attcagcagg cgtcgcgtta 1860
ctgtaccgta atgttacatt aaacgtaaat ggcagtatta caaaaggaaa acaattggaa 1920
aaacaaaaat cggacaaaat taaaatacag attcgtttct aa 1962

```

- 5 <210> 6
- <211> 1116
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Fusión Pir1b-lectina de H.pomatia

- <400> 6

ES 2 475 973 T3

atgacatgtg aattccctag gctcgagcaa cgggtgcggg agcaggggtc caacatggag	60
tgccccaaaca acctgtgctg ctgcgagtac gggfactgcg gcatgggagg cgactactgc	120
ggcaagggct gccagaacgg cgctgctgg acctccaagc gctgcggttc ccaggccggt	180
ggcgccaact gcaccaaaaa ccagtgctgc tcccagtatg gctactgagg cttcgggcgg	240
gagtaactgcg gtgcgggctg ccaggggcgg cctgcccgg ctgacatcaa gtgcgggctg	300
caggctggcg gcaagctgtg cccgaacaac ctctgctgca gccagtgggg cttctgcggg	360
ctgggcagcg agttttgcgg tgggtggtgc cagagcggcg cctgcagcac ggacaagcgg	420
tgcggcaagg acgctggcgg ccgggtctgc actaacaact attgctgctc caagtggggc	480
tcttgccgca tcggcccggg ctattgaggg gcgggctgcc agtcggggcg ctgagcggcg	540
ggcaactggca ccgggtgtga cgattataag gaagatgagc acaagagcgg cgagaacctg	600
tactttcagg gccacaacca tcggcacaag cagggtacag gcgccgctgc tatctctcaa	660
attggtgacg gtcaaatcca agccactacc aaaaccactg ctgctgctgt ttctcaaatt	720
ggtgacggtc aaatccaagc cactactaaa accaaaagctg ctgctgtctc tcaaattggt	780
gacggccaaa tccaagccac caccaagact acctcagcta agactaccgc tgcagccgtc	840
tcccaaattg gtgacggtea aattcaagcc actactaaaa ccaaagctgc tgctgtctct	900
caaattggtg acgggtcaaat ccaagccact accaaaacaa ctgctgcagc tgtctctcaa	960
attggtgacg gtcaaatcca agccactact aaaaccactg ctgctgctgt ttctcaaatt	1020
ggtgacggtc aaatccaagc caccaccaat actactgttg ctccagtctc ccaaatcact	1080
gatggccaaa tccaagccac aactttaact tcttga	1116

<210> 7
 <211> 1320
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Fusión Pirib-lectina de L. culinaris

10

<400> 7

atgacatgtg aattccctag gctcgagaact gagactacgt cgtttagcat taccaagttt	60
tcccctgacg agcagaacct gatcttccag ggcgacggct acaccacgaa gggcaagctg	120

ES 2 475 973 T3

accctgacga aggccgtcaa gagcactgtg ggccgggccc tgtatagcac cccattcac	180
atttgggacc gcgacaccgg gaacgtggcc aacttcgtga cctcctteac cttcgtgatc	240
gacgccccca gctcgtacaa cgtggcggac ggcttcacct tcttcategc gctcgtggac	300
acgaagccgc agacgggccc cgggtatctg ggcgctctca actcgaagga gtacgacaag	360
acttcgcaga ccgtggccgt ggagttcgat actttctaca acgaggcctg ggaccccagc	420
aacaaggagc gccacattgg catcgacgtg aactcgatca agtcgggtgc caccaagagc	480
tggaacctgc agaacggcga gcgcgcgaac gtggtcatcg cgttcaacgc cgccacgaac	540
gtcctgaccg tcaacctgac ctaccctaac tccttgagg aggagaacgt gacttcctac	600
acgctgaacg aggtggtgcc gctgaaggac gtggtgcccg agtgggtgcg gatcggcttc	660
agcgccacca cgggcccgtga gttcgcgcc cagcaggtgc actcctggtc ctttcacagc	720
gagctgggtg gcaccagcag ctccggcacg ggaccgggtg tcgacgatta taaggacgat	780
gacgacaaga gcggcgagaa cctgtacttt cagggccaca accatcggca caagcacggt	840
acaggcgccg ctgctatctc tcaaattggt gacgggtcaaa tccaagccac taccaaaacc	900
actgctgctg ctgtttctca aattggtgac ggtcaaatcc aagccactac taaaaccaa	960
gctgctgctg tctctcaaat tggtagcggc caaatccaag ccaccaccaa gactacctca	1020
gctaagacta cogctgcagc cgtctcccaa attggtgacg gtcaaatca agccactact	1080
aaaaccaaag ctgctgctgt ctctcaaatt ggtgacggtc aaatccaagc cactaccaa	1140
acaactgctg cagctgtctc tcaaattggt gacgggtcaaa tccaagccac tactaaaacc	1200
actgctgctg ctgtttctca aattggtgac ggtcaaatcc aagccaccac caatactact	1260
gttgctccag tctcccaaat cactgatggc caaatccaag ccacaacttt aacttcttga	1320

<210> 8
 <211> 1479
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Fusión Pirla-lectina de T. vulgaris

10

<400> 8	
atgacatgtg aattccctag gctcagcaa cggtaggggg agcaggggtc caacatggag	60
tgccccaaaca acctgtgctg ctgcagtac gggtagctgc gcatgggccc cgactactgc	120
ggcaagggct gccagaacgg cgcctgctgg acctccaagc gctgcggttc ccaggccggt	180
ggcgccacct gcaccaaaa ccagtgtgc tcccagtatg gctactgcgg cttcggcgcg	240
gagtactgcg gtgcgggctg ccaggggccc ccctgcgcg ctgacatcaa gtgcgggtcg	300

ES 2 475 973 T3

caggctggcg gcaagctgtg cccgaacaac ctctgctgca gccagtggg cttctgcggt 360
ctgggcagcg agttttgctg tgggtggtgc cagagcggcg cctgcagcac ggacaagccg 420
tgcggcaagg acgctggcgg ccgggtctgc actaacaact attgctgctc caagtggggc 480
tcctgctgca tggccccgg ctattgctgt gctggctgcc agtcggggcg ctgctgacggc 540
ggcactggca ccggtgtcga cgattacaag gatgatgatg acaagagcgg cgagaacctg 600
tacttccagg gccacaacca ccgccataag cacggtacag gctccgctgc tatctctcaa 660
attggtgacg gtcaaatcca agccactacc aaaaccactg ctgctgctgt ttctcaaatt 720
ggtgacggct aatccaagc cactactaaa accaaagctg ctgctgctc tcaaattggt 780
gacggccaaa tccaagccac caccaagact acctcagcta agactaccgc tgcagccgct 840
tcccaaattg gtgacggtea aattcaagcc actactaaaa ccaaagctgc tggctgtctc 900
caaattggtg acggtcaaat ccaagccact accaaaacaa ctgctgcagc tgtctctcaa 960
attggtgacg gtcaaatcca agccactact aaaaccactg ctgctgctgt ttctcaaatt 1020
ggtgacggct aatccaagc caccaccaat actactgttg ctccagtctc ccaaactcact 1080
gatggccaaa tccaagccac aactttaact tctgcaacca ttataccatc tccagctcca 1140
gctccaatta ctaatggcac tgaccagta actgctgaaa catgcaaaaag cagtggcact 1200
ltagaaalga actlaaaggg lgglatcctg actgacggla aaggtagaat tggttctatc 1260
gttgccaaca gacaattcca attcgtggt cctccaccac aagctggtgc tatctatgct 1320
gctggttggc ccatcaccac agaaggtaac ttggccatcg gtgaccagga tactttttac 1380
caatgttgtg caggaaactt ctacaactta tacgatgagc acattggaac tcaatgtaat 1440
gcagtccacc tacaagctat cgatttgctc aactgttag 1479

<210> 9
<211> 4817
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> fusión lectina L. culinaris -Fas1

10

<400> 9
atggccaagc tgaccagcgc cgttccgggt ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc 60
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggt 120
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcate agcgcggctc aggaccaggt gagtcgacga 180
gcaagcccgg cggatcaggc agcgtgcttg cagatttgac ttgcaacgcc cgcattgtgt 240
cgacgaaggg ttttggctcc tctgtcgtg tctcaagcag catctaacc tgcgtcggcg 300
tttcatttg caggaccagg tgggtgccga caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcggc 360

ES 2 475 973 T3

cctggacgag	ctgtacgccg	agtggtcgga	ggtcgtgtcc	acgaacttcc	gggacgcctc	420
cgggcccgcc	atgaccgaga	tcggcgagca	gccgtggggg	cgggagttcg	ccctgcgcga	480
cccggccggc	aactgcgtgc	acttcgtggc	cgaggagcag	gacgcccccg	tgaagcagac	540
cctgaacttc	gacctgctga	agctggcggg	cgacgtggag	agcaaccocg	gccccctcga	600
catggcgtct	catgcccgcg	cccagagcgc	tttcacagct	gtggccactg	cagcggaccc	660
gggcctcgac	gactacaagg	acgacgacga	caagtccggc	ctcgagactg	agactacgtc	720
gtttagcatt	accaagtttt	cccctgatca	gcagaacctg	atcttccagg	gcgacggcta	780
caccacgaag	ggcaagctga	ccctgacgaa	ggccgtcaag	agcactgtgg	gccgggcgct	840
gtatagcacc	cccattcaca	tttgqgaccg	cgacaccggg	aacgtqgcca	acttcqtqac	900
ctccttcacc	ttcgtgatcg	acgccccag	ctcgtacaac	gtggcggacg	gcttcacctt	960
cttcacgcg	cctgtggaca	cgaagccgca	gacggcggc	gggtatctgg	gcgtcttcaa	1020
ctcgaaggag	tacgacaaga	cttcgcagac	cgtggccgtg	gagttcgata	ctttctaaa	1080
cgcgccctgg	gaccccagca	acaaggagcg	ccacattggc	atcgacgtga	actcgatcaa	1140
gtcgggtgcc	accaagagct	ggaacctgca	gaacggcgag	cgcgogaacg	tggtcacgc	1200
gttcaacgcc	gccacgaacg	tcctgaccgt	cacctgacc	taccctaact	ccctggagga	1260
ggagaacgtg	acttcctaca	cqctgaacga	ggtqgtgccg	ctqaaqgacg	tqqtgcccg	1320
gtgggtcgcg	atcggttca	gcgccaccac	gggcgtgag	ttcgcgcgcc	acgaggtgca	1380
ctcctggctc	tttcacagcg	agctgggtgg	caccagcagc	tccggcacgg	gcaccggtga	1440
ctataaggac	gacgacgaca	agtccggtga	gaacctgtac	tttcagggcc	acaaccaccg	1500
ccacaagcac	accggtgctg	acctgttctt	ttttacctca	gccctccaac	tgagcggcct	1560
tgtaacgttc	ttcaacgcta	ccggaaggaa	catcacgtta	ttcgcgccca	gtgatcaggt	1620
tgggtcttgt	acgtagctgg	agggcttctg	attatcaact	cccctcgaac	cctccactga	1680
ccccaaccta	cgacctcaca	cccatacgcg	gcccaccgaa	ggcgtacta	gcggcgctgc	1740
cggccctgaa	cctgaatcag	tcccagctgg	tgactaacgc	agtgtcatg	gcgccagtgc	1800
tcatgtacca	cgctttcgtg	ccagcgacca	acaacgcctc	tgtccctccc	ggaatttcgt	1860
actacaacgc	gttgaagtga	ggcggggcg	cgagtttaga	aggttgacct	ggatgcggcc	1920
acacggctcg	cattgcagcc	ttttcatggt	tgtgagtacc	tcaatgtag	gccaaaaacc	1980
gcgccaacgt	gccaacctac	agcacggatg	gcagcgtcag	oggcaaccag	ctggcgatta	2040
cgaggacggg	gtcgggcggg	ctgcgggtca	cctccatcgg	cagcgacgcc	aacgtgatca	2100
aggtggacct	tcccaactcc	gggtgagaga	gcgcgtggct	ggcggcgcca	atgcgctggc	2160

ES 2 475 973 T3

tcctttcgcc tatgtcagga tgagtgtcgt ttcggtcggg actggatcgg gtcgcggtgc	2220
atggggaagc ggcacccggg agaacgtgta tgggcaagtg gatgggtacc cgaacagtct	2280
gcctccgcgc gtcacacctc aactatctcc tctagacatg tggcattgta ttgtcgtga	2340
caacagggtcc acggtagtgc acgtcgtgga cgcggtgctt ctcccgttct acccgtcagt	2400
gtactccgtg agttgcagtg caagtgcggg cgcaggcgca agctgcagaa accaaaccgg	2460
gcaaggcgca tgctcggctc ctgcagccaa ccatatggcg cagacctgcc ttctgcagcg	2520
ccgacctaca tgaggcagcg acccaacacg ttgcccaacc cctgcgcctg cacgtgcgcc	2580
atgcaggctg tggcgcgcac ctctgcctg agcacgtgg ccgcgctggt cggctctgcc	2640
agcgcagcc tgggtgccaa gctgcagtg cgtgtgtgtg ttgagcgggt ggtgaagatt	2700
tgggtggcgg gctgggcacg ccgccgttct tgggttacgg caagtgcctg gttttgctga	2760
ctgcgcccgg agttgtgcgc gtgctcgcgc ctctctggcg catcacagcg cccctgatgg	2820
tgtgcactga agtggcgatt gcgttccgtc ctgggcatgt tctacaggac actacgggtg	2880
tctacaccgt ctttgcctcc tacaatgcgt gagttgtggt tcagcaccga ctggttgcgc	2940
caggccgaca ggccgacglt gcgtcaagtc gcgaaccgtg cgcggtgca agcattgccc	3000
tgaccggctt tggattgccc agcggctcct acgctgacct tccctcgtg tggctccctc	3060
cctcgtgtgc acagcgcctt caeggecgcc ctggcccccct ccggcctcaa cacgaegatt	3120
gcgcagctgg cggcgcagcc cgcctcgtg cagtccatcc tgtcgtacca cgtcgtgccc	3180
ggcctgtaca acgcccctc gttttccacc acaccatca ccgtcaccac cctgacgtat	3240
ggcttcgctg catgcatgcg caccacagct gtgtgcgcca ccgtgcagag gcaggcctca	3300
accttcagat cagtcctgatc agtttgacca gttgcattcc gacacacgac gatgccctgg	3360
catgcctcaa tgcccgcctc cgcagtggcc agaagctgac gctggtgaag gacggcactt	3420
cgtctcgggt gaagacggcc gacggcatga cggccaacct gctgcaggcg cgcgacctgc	3480
cgtgcggctt cacggaccag tgagttggtc gcgcgagtga ccagcatagc acgggacaag	3540
gactcgtggc atcccgttgt tcaggatggg tttgcaccgg cgtaggagcc ccaaatccca	3600
acatgcacag ctaacgcatt tcacactaca cgtccaacct gtcaggggca cgttccgcgc	3660
gaccgtgcac gtgatcgaca aggtactcgt ccctccccct gttacctccg tggetgcggc	3720
gctggccctg cgcaccgacg tcaacacact gctggcggcc gtcaggcgag aggggtccta	3780
ctcggctcgc atcaacaggg gacttgccgc aaccggcgcc gttacaaacg ctatgcgctt	3840
actgcgcctt ctccggcaca tactgcgtcc atttgactgc attacgaagg actggactta	3900
ccccagaatt gttcccctgc ctgtgctgca tgccctgaaa ccctcagcac cacattcacc	3960
ggcacgcttc tggcgcctat cgaactcgcc ttcacggcgc tgetggcggc caatggcagc	4020

ES 2 475 973 T3

atcagcgccg cgcagctgct gggcaacacc acggcgctga agaagatcct ggacgtgagt	4080
gctcgtgcta tgcaggcgtc ctcaggccac agacctctat gtacagccag cgtgectgac	4140
cttgtggtgc ttctggctgt gttcaggcgc acgtggtcac ggggtcggtg ctgacggtgg	4200
cgggtctcac caacggccag aacattacca ccaggtgggg gcattagcca ttgggcttga	4260
ggtgtccccc acattgggtg gttgccgctg cggcttttgg tcattatgct gagtagaatg	4320
ctatgctctt ggcttgatct ttgcgttgca tcatgtatcc tgttcgcagt ggccggccta	4380
cgatcacggt tgtcaagacc ggaaccacga ccagctgaa gctgggcaac agcgtggtca	4440
gcgtggtcgg ggcggagggt gcgattggca gcaggtgggt gcacctgacc tcttcattgc	4500
caccttctg cagcgtgat gatggcttct ttgcgacgtt atcgacgtgc ttaaaaacgc	4560
aacacaacaa gtgccatcgc cgcgagcctg catgctgtgt tatggtgtca acgcgcccc	4620
taccccatgc catgccccct ggtgtttga gcgcgacgct catcgtcadc gacggtgtcc	4680
tgggtccgctc cggcgtttcc accgtgacct cgggaggcgg tggcggcgc gcagcggcaa	4740
ctacgcgctc cttcgtgctc atgctgtgga gcgttgtggc ggcagcgtg ctgctagcat	4800
tccagcgctt gcagtag	4817

5 <210> 10
 <211> 4256
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> fusión lectina truncada L. culinaris-Fas1

atggccaagc tgaccagcgc cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc	60
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgcgggt	120
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcadc agcgcggctc aggaccagggt gagtcgacga	180
gcaagcccgg cggatcaggc agcgtgcttg cagatttgac ttgcaacgcc cgcattgtgt	240
cgacgaaggc ttttggctcc tctgtcgtg tctcaagcag catctaacc cgcgtcgcgg	300
tttccatttg caggaccagg tgggtcccga caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcggg	360
cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc	420
cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg cgggagttcg cctgcccga	480
cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gacgccccgg tgaagcagac	540
cctgaacttc gacctgctga agctggcggg cgacgtggag agcaaccgg gccccctga	600
catggcgtct catgcgcgg cccagagcgc tttcacagct gtggccactg cagcggaccc	660

ES 2 475 973 T3

gggcctcgac gactacaagg acgacgacga caagtccggc ctcgaggtga cttcctacac	720
gctgaaacgag gtggtgcccgc tgaaggacgt ggtgcccag tggtgcccga tcggtctcag	780
cgccaccacg ggcgctgagt tcgcccga cgaggtgac tcctggtcct ttcacagcga	840
gctgggtggc accagcagct ccggcacggg caccggtgac tataaggacg acgacgacaa	900
gtccggtgag aacctgtact ttcagggcca caaccaccgc cacaagcaca ccggtgtcga	960
cctgttcctt tttacctcag ccctccaact gagcggcctt gtaacgttct tcaacgctac	1020
cggaaggaac atcacgtlal tcgcccag tgatcaggtt ggtgcttcta cgtagctgga	1080
gggcttctga ttatcaactc ccctcgaacc ctccactgac cccaacctac gacctcacac	1140
ccatacgcgg cccaccgaag gcgctactag cggcgctgcc ggccctgaac ctgaatcagt	1200
cccagctggt gactaacgca gtgctcatgg cggcagtgct catgtaccac gctttcgtgc	1260
cagcgaccaa caacgcctct gtccctcccg gaatttcgta ctacaacgcy ttgaagtgag	1320
gcggggggcg gagtttagaa ggttgacctg gatgcccga cagcgctcgc attgcagcct	1380
tttcatgttt gtgagtacct caatgttagg ccaaaaaccg cgccaacgtg ccaacctaca	1440
gcacggtgg cagcgtcagc ggcaaccagc tggcgattac gaggacggtg tcgggcccgc	1500
tgcgggtcac ctccatcggc agcagcgcga acgtgatcaa ggtggacctt cccaactccg	1560
ggtgagagag cgcgtggtg gcggcgccaa tgcgctggtt cctttcgcct atgtcaggat	1620
gagtgtcgtt tcgttcgga ctggatcggg tcgcggtgca tggggaagcg gcaccggta	1680
gaacgtgtat gggcaagtgg atgggtaccg gaacagtctg cctccgcccg tcacacctca	1740
actatctcct ctagacatgt ggcattgtat tgcgctgac aacaggtcca cggtagtgca	1800
cgctcgtggc gcgggtgctt tcccgttcta ccgctcagtg tactccgtga gttgcagtg	1860
aagtgcgggc gcagggcga gctgcagaaa ccaaaccggg caaggcgcct gctcggctcc	1920
tgcagccaac cataaggcgc agacctgcct ttgcgagcgc cgacctacat gaggcagcga	1980
cccaacacgt tgccaacc ctgcgctgc acgtgcgcca tgcaggtgtt ggcgcccacc	2040
tctgcctga gcacgctggc cgcgctggtc ggctctgcca gcgccagcct ggtgtccaag	2100
ctgcaggtgc gtgtgtgtgt tgagcgggtg gtgaagattt ggtggcggg ctgggcacgc	2160
cgccgttctt gggttacggc aagtgcctgt ttttctgac tggcggcga gttgtgcgcg	2220
tgctcgcgcc tctctggcgc atcacagcgc ccctgatggt gtgactgaa gtggcgattg	2280
cgttccgtcc tggcatgtt ctacaggaca ctacgggtgt ctacaccgtc tttgtccct	2340
acaatgcgtg agttgtggtt cagcaccac tggttgtgcc aggcgcagc gccgacgtt	2400
cgteaagteg cgaaccgtgc gcggctgcaa gcattgcctt gaccgcttt ggattgcca	2460
gggctccta cgtgacctt ccctcgtgtt ggctccctcc ctggtgtgca cagcgcctt	2520

ES 2 475 973 T3

acggccgccc tggccccctc cggcctcaac acgacgattg cgcagctggc ggcgcagccc 2580
gcccctgctgc agtccatcct gtcgtaccac gtcgtgcccg gcctgtacaa cgcctcctcg 2640
ttttccacca caccatcac cgtcaccacc ctgacgtatg gcttcgctgc atgcatgcgc 2700
accagcgtg tgtgcgccac cgtgcagagg caggcctcaa ccttcagatc agtctgatca 2760
gtttgaccag ttgcattccg acacacgacg atgccctggc atgcctcaat gccccgctcc 2820
gcagtggeca gaagctgacg ctggtgaagg acggcacttc gctgtcggtg aagacggccg 2880
acggcatgac ggccaacctg ctgcaggcgc ggcacctgcc gtgcggcttc acggaccagt 2940
gagttggtcg cgcgagtac cagcatagca cgggacaagg actcgtggca tcccgttgtt 3000
caggatgggt ttgcaccggc gtaggagccc caaatcccaa catgcacagc taacgcattt 3060
cacactacac gtccaacctg tcaggggcac gttccgcgcg accgtgcacg tgatcgacaa 3120
ggtactcgtc cctccccctg ttacctccgt ggtgcggcg ctggccctgc gcaccgacgt 3180
caacacactg ctggcggccg tcaaggcgga ggggtcctac tcggctgcga tcaacaggtg 3240
acttgcggca accgqcqccg ttacaaacgc tatcgcctta ctccccttc tcggqccat 3300
actgcgtcca tttgactgca ttacgaagga ctggacttac cccagaattg tccccctgcc 3360
tgtgctgcat gcctgaaac cctcagcacc acattcaccg gcacgctctc ggcgccatc 3420
gactcggcct tcacggcgtc gctggcggcc aatggcagca tcagcggcgc gcagctgctg 3480
ggcaacacca cggcgtgaa gaagatcctg gacgtgagtg ctcgtgctat gcaggcgtcc 3540
tcaggccaca gacctctatg tacagccagc gtgcctgacc ttgtggtgct tctggctgtg 3600
ttcaggcga cgtggtcacg gggtcggtgc tgacggtggc ggtctcacc aacggccaga 3660
acattaccac caggtggggg cattagccat tgggcttgag gtgtcccca cattgggtgg 3720
ttgccctgc ggcttttggc cattatgctg agtagaatgc tatgctcttg gcttgatctt 3780
tgcgttgcat catgtatcct gttcgcagtg gcggcgctac gatcacggtt gtcaagaccg 3840
gaaccacgac ccagctgaag ctgggcaaca gcgtggtcag cgtggtcggg gcggagggtg 3900
cgattggcag caggtgggtg cacctgacct cttcattgcc accttctgc agcgtgatg 3960
atggtctctt tgcgacgta tcgacgtgct taaaaacgca acacaacaag tgccatcgcc 4020
gcgagcctgc atgctgtgtt atggtgtcaa cgcgccccat accccatgcc atgccccctg 4080
gtgtttgcag cgcgacgctc atcgtcatcg acggtgtcct ggtgcctcc ggcgtttcca 4140
cgtgacctc gggaggcggg ggcggcggc cagcggcaac tacgcctcc ttcgtgctca 4200
tgctgtggag cgttgtggcg gcagcgtgc tgctagcatt ccagcgcctg cagtag 4256

<210> 11

<211> 4817

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> fusión lectina E. cristagalli-Fas1

10 <400> 11

ES 2 475 973 T3

atggccaagc tgaccagcgc cgttccggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc	60
gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggc	120
gtggtccggg acgacgtgac cctgttcacg agcgcggctc aggaccaggt gagtcgacga	180
gcaagcccgg cggatcaggc agcgtgcttg cagattgac ttgcaacgcc cgcattgtgt	240
cgacgaaggg ttttggctcc tctgtcgtg tctcaagcag catetaacce tgcgtcgcgc	300
tttccatttg caggaccagg tgggtgccga caacaccctg gcctgggtgt ggggtcgcgg	360
cctggacgag ctgtacgcc agtggtcggg ggtcgtgctc acgaacttcc gggacgcctc	420
cgggccggcc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcga	480
cccgccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gacgccccg tgaagcagac	540
cctgaacttc gacctgctga agctggcggg cgacgtggag agcaaccocg gccccctcga	600
catggcgtct catgccgcgg cccagagcgc tttcacaqct gtggccactg cagcggacce	660
gggcctcgac gactacaagg acgacgacga caagtcggc ctcgaggtgg agactattag	720
cttttccitt tcggagtttg agcctggtaa cgataacctg accctgcagg gtgctgcct	780
cattaaccag agcggcgtgc tgcagctcac taagatcaac cagaaccgga tgcggcgtt	840
ggactcgacg ggcgcgaccc tgtacacgaa gccctgcac atgtgggaca gcaccacggg	900
gaccgtggct tccttcgaga ctcgcttttc gttctccac gagcagccct acaccgcgcc	960
tctcccggcc gacggcctgg tgttctttat gggccccacc aagagcaagc cggcccaggg	1020
ctacggttac ctgggcgtgt tcaacaactc caagcaggac aacagctacc agaccctggc	1080
ggtcgagttt gacaccttct cgaaccctc ggaccgcct caggtgcccc acatcgggat	1140
cgacgtgaac tcgattcgct cgatcaagac ccagccgttt cagctggaca acgccaagt	1200
ggcgaacgtg gtgattaagt acgacgcccc cagcaagatc ctgcatgtgg tectggtgta	1260
cccagctcc cggcccatct acacgatcgc cgagattgtg gacgtgaagc aggtgctgcc	1320
ggactgggtg gatgtgggtc tgtcggcgc cactggcgcg cagcgggatg cggcggagac	1380
gcacgacgtg tactcgtggt ccttccaggc ttcctgcgc gaggggaccg gcaccggtga	1440
ctacaaggac gacgatgaca agtcgggcga gaacctgtac tttcagggcc acaaccaccg	1500
ccacaagcac accggtgtcg acclylctct ttttacctca gccctccaac tgagcggcct	1560
tgtaacgttc ttcaacgcta ccggaaggaa catcacgtta ttcgcgcccc gtgatcaggt	1620

ES 2 475 973 T3

tggtgcttgt acgtagctgg agggcttctg attatcaact cccctcgaac cctccactga	1680
ccccaaccta cgacctcaca cccatacgcg gccacccgaa ggcgctacta gcggcgtgc	1740
cgccctgaa cctgaatcag tcccagctgg tgactaacgc agtgetcatg gcgccagtgc	1800
tcatgtacca cgctttcgtg ccagcgacca acaacgcctc tgtccctccc ggaatttctg	1860
actacaacgc gttgaagtga ggcgggggcg cgagtttaga aggttgacct ggatgcggcc	1920
acacggctcg cattgcagcc ttttcatggt tgtgagtacc tcaatgttag gccaaaaacc	1980
gcgccaacgt gccaacctac agcacggatg gcagcgtcag cggcaaccag ctggcgatta	2040
cgaggacggt gtcgggcggt ctgcgggtca cctccatcgg cagcgcagcc aacgtgatea	2100
aggtggacct tcccaactcc ggggtgagaga gcgcgtggct ggcgcgcga atgcgctggc	2160
tcctttcgcc tatgtcagga tgagtgtcgt ttcggtgcgg actggatcgg gtcgcggtgc	2220
atggggaagc ggcacccggt agaacgtgta tgggcaagtg gatgggtacc cgaacagtct	2280
gcctccgcgc gtcacacctc aactatctcc tctagacatg tggcattgta ttgtcgtga	2340
caacaggctc acggtagtgc acgtcgtgga cgcggtgctt ctcccgctct acccgtcagt	2400
gtactccgtg agttgcagtg caagtgcggg cgcaggcgca agctgcagaa accaaaccgg	2460
gcaaggcgca tgctcggctc ctgcagccaa ccatatggcg cagacctgcc ttctgcagcg	2520
ccgacctaca tgaggcagcg acccaacacg ttgcccaacc cctgcgcctg cacgtgcgcc	2580
atgcaggctg tggcgcgcac ctctgcctg agcacgctgg ccgcgctggt cggctctgcc	2640
agcgcagcc tgggtgtccaa gctgcagggt cgtgtgtgtg ttgagcgggt ggtgaagatt	2700
tgggtggcgg gctgggcacg ccgcccgtct tgggttacgg caagtgcctg gttttgctga	2760
ctggcggcgg agttgtgcgc gtgctcgcgc ctctctggcg catcacagcg cccctgatgg	2820
tgtgcaactga agtggcgatt gcggtccgct ctgggcatgt tctacaggac actacgggtg	2880
tctacaccgt ctttgctccc tacaatgcgt gagttgtggt tcagcaacca ctggttgtgc	2940
caggccgaca ggccgacggt gcgtcaagtc gcgaaccgtg cgcgctgca agcattgcc	3000
tgaccggctt tggattgccc agcggctcct acgctgacct tccctcgtg tggctccctc	3060
cctcgtgtgc acagcgcctt cacggcgcgc ctggccccct ccggcctcaa cacgacgatt	3120
gcgcagctgg cggcgcagcc cgcctcgtg cagtccatcc tgtcgtacca cgtcgtgcc	3180
ggcctgtaca acgcctcctc gttttccacc acaccatca ccgtcaccac cctgacgtat	3240
ggcttcgctg catgcatgcg caccacagct gtgtgcgcca ccgtgcagag gcaggcctca	3300
accttcagat cagtctgac agtttgacca gttgcattcc gacacacgac gatgccctgg	3360
catgcctcaa tgccccgctc cgcagtggcc agaagctgac gctggtgaag gacggcactt	3420

ES 2 475 973 T3

cgctgtcggg gaagacggcc gacggcatga cggccaacct gctgcaggcg cgcgacctgc 3480
 cgtgcggcctt cacggaccag tgagttggtc gcgcgagtga ccagcatagc acgggacaag 3540
 gactcgtggc atccccgtgt tcaggatggg tttgcaccgg cgtaggagcc ccaaatccca 3600
 acatgcacag ctaacgcatt tcacactaca cgtccaacct gtcaggggca cgttccgcgc 3660
 gaccgtgcac gtgatcgaca aggtactcgt ccccccct gttacctcgg ttgctgcggc 3720
 gctggccctg cgcaccgacg tcaacacact gctggcggcc gtcaaggcgg aggggtccta 3780
 ctgggtcgcg atcaacaggt gacttgcggc aaccggcgcc gttacaaacg ctatgcgctt 3840
 actgccgctt ctggggcaca tactgcgtcc atttgactgc attacgaagg actggactta 3900
 cccagaatt gttcccctgc ctgtgctgca tgcctgaaa cccccagcgc cacallcacc 3960
 ggcacgcttc tggcgcccat cgactcggcc ttcacggcgc tgctggcggc caatggcagc 4020
 atcagcgccg cgcagctgct gggcaacacc acggcgctga agaagatcct ggacgtgagt 4080
 gctcgtgcta tgcaggcgtc ctcaggccac agacctctat gtacagccag cgtgcctgac 4140
 cttgtggtgc ttctggtgt gttcaggcgc acgtggtcac ggggtcggtg ctgacggtgg 4200
 cgggtctcac caacggccag aacattacca ccaggtgggg gcallagcca ttgggcttga 4260
 ggtgtcccc acattgggtg gttgcgctg cggcttttgg tcattatgct gtagtagaatg 4320
 ctatgctctt ggcttgatct ttgcgttcca tcatgtatcc tgttcgcagt ggcggcgcta 4380
 cgatcacggt tgtcaagacc ggaaccacga cccagctgaa gctgggcaac agcgtggtca 4440
 gcgtggtcgg ggcggagggt gcgattggca gcaggtgggt gcacctgacc tcttcattgc 4500
 caccttcctg cagcgtgat gatggcttct ttgcgacgtt atcgacgtgc ttaaaaacgc 4560
 aacacaacaa gtgccatcgc cgcgagcctg catgctgtgt tatggtgtca acgcgcccc 4620
 taccceatgc catgccccct ggtgtttgca gcgcgacgct catcgtcacc gacggtgtcc 4680
 tgggtgcgtc cggcgtttcc accgtgacct cgggaggcgg tggcggcgcc gcagcggcaa 4740
 ctacgcccgc ctctcgtcgc atgctgtgga gcgttgtggc ggcagcgcgt ctgctagcat 4800
 tccagcgcct gcagtag 4817

5 <210> 12
 <211> 3121
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> lectina H. pomatia-GP1

<400> 12
 atggccaagc tgaccagcgc cgttccggtg ctcaaccgcg gcgacgtcgc cggagcggtc 60
 gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga ctctcggcgt 120

ES 2 475 973 T3

gtggtccggg acgacgtgac cctgttcate agcgcgggtcc aggaccaggt gagtccgacga 180
gcaagcccgg cggatcagge agcgtgcttg cagatttgac ttgcaacgcc cgcattgtgt 240
cgacgaaggc ttttggtctc tctgtcgtg tctcaagcag catctaaccc tgcgtccgg 300
tttccatttg caggaccagg tgggtccgga caacaccctg gcctgggtgt ggggtccggg 360
cctggacgag ctgtacgcc agtggtcgga ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc 420
cgggcccggc atgaccgaga tgggcgagca gccgtggggg cgggagttcg ccctgcccga 480
cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gacgccccgg tgaagcagac 540
cctgaacttc gacctgctga agctggcggg cgacgtggag agcaaccggg gccccctcga 600
catgatcggg cggcaaacac ctgccccctc tctggggggc gtcaacqctc tgatggtgt 660
gctgccttc gtcgcgagcg ctaacgcgca gtgtgtacct ggcggtatct tcaactgcct 720
cgagcagtc gccctgaaga ccattgcttt cagcgcggcc atcgaccgg agcagacgtt 780
tgacgcaaac cagggtgtca tctacgacat cgtgattacg aaccacggca acgcctacga 840
taactccacc ggcctgttca ccgcgcgggt ggacggcatg tacagcttcc aactgaacct 900
gctcacgatt aaggagaagg agggctggct ggagctcgtg cacaacggtc agctcaaggt 960
gagcgtctac gogaagcagg acagcacgta cgattcgtcg agcaactcgg tcatcatcaa 1020
gatqaaggag ggtgatcggg tgaacgtgag gcccacaag aagtcgggtc tgttcggccg 1080
cgacgacgag ctgtacaaca cgttctccgg ccaacttctg tccggcctgg gcaccggcac 1140
cggtgactac aaggacgacg acgacaagtc cggcgagaac ctgtacttcc agggccacaa 1200
ccaccgccac aagcacaccg gtgtcgaccc tccctctccg gccccaccgt ctctgcccc 1260
tccctccccg gctccccctg caccgcacc cccttcgcca gcacccccga gccagggcc 1320
cccctgccc gcccccggga gccgcggag ccctgccc ccgagccctg cgcgcggag 1380
ccggcccccc ccgtcccccg ccccccgtc tccgcgcgg ccctgcctg cgcctcttc 1440
ccctgcgcca ccgtcccccg cccccctc gccccggag ccggccccctc cgtgcgccag 1500
ccgcgcggcc cccccctg cgtgccccc gtcgcccagc ccacccctgc caccctccc 1560
agcgcgcgcc agccctccc ccccggctcc gccgtcaccg agcccggccg tccctcccag 1620
ccccgcccc ccttcgcca cgcctccgtc cccagccct cccgtgcgc ccagccccg 1680
ccgcctctc cccgccccg ccgtgcggcc ctgcgggca ccgcccctcc ctgctcccc 1740
ggtgcggcct agccctgcc ccccgctgcc tccctgcca ggcccccct cccccccag 1800
ccccgcccc ccttcgccc cccccccg tccccggag cccgtgccc ctctcggc 1860
gccccccag cccgcccct cctcccctaa gccgcggcg ccacccccg ctcccagcc 1920

ES 2 475 973 T3

accgcctccc ccgcgcgccc gtccccgatt ccccgccaac actcccatgc ccccatcccc 1980
 tccctccccc cccccctccc cggcgccacc cacacccccc accccccctt caccgtcgcc 2040
 gccgtcgccc gttccgcca gccccagcgc tgtgcgcgcc agccccgcgc cgcctcccc 2100
 agtcccage ccccccta gcccgcctcc gccgaccccg tccccagcc cctcgcttc 2160
 gccctcccc agccccctgc cctccccgag cccctcgccc tccccgagcc ccagccgat 2220
 cccclcccc tgcgcaagc ccagccctc acccgtggcc gtcgaagctgg ttgggctga 2280
 tgatgccatc gccttcgacg acctgaacgg cacctcgacc aggccccgct ccgcctcgcc 2340
 catggtcgcc gagcccgaca tgcgcggcac caagtgaag ggcaacctga agggctggat 2400
 gcccaagccc agcagggctg gtccctaggaa gactttgctg tttgctgcgc tgccctaggca 2460
 tcatgacgcc tgtatgacgt tgtcttttga aggaagtccg aggattgcgc tgagttggga 2520
 ccgcacgcaa gcaacttatc cacgccacgg tccctctcca tcttctctt cgcagaacct 2580
 tcgctggggc caggctgtgt tctccggtg ccgcaccgtg ggctccgctc ctaacgtcac 2640
 catcccgctc gcgtgagtcg gacttttgag ccgcctgtac tgtcgtccgg tcttggcct 2700
 cgtttgtgct gatgatctgc ccatatcaa ctggagcttg cttgactgac cgtctttctc 2760
 atccgttggg cgcctcacct tgctaccgg cagtttcgct accgagaagc ccgcctgat 2820
 ctactccagc atcgagctgg tctgtataca cactggtgcc accctcatcc gcgtgcccac 2880
 ccgcgccaat gtgaccgcga gccagatcag gtgccctggc ttcctgacct atggaccac 2940
 cccattgccc ggctaccca ctggcatcga cgcaccacc tggcccaact ggaagattgc 3000
 ccgctgctgc atcaacatgg gcgcgggcaa caagaagccc aagacctcga ttgacgcggt 3060
 ccgctcaac ctgaagagcg gttccggcga ctacaaggac gacgacgaca agtccggcta 3120
 a 3121

5 <210> 13
 <211> 2872
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> lectina truncada L. culinaris-GP1

<400> 13
 atggccaagc tgaccagcgc cgttccggtg ctaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc 60
 gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggt 120
 gtggtcggg acgacgtgac cctgttcac agcgcggctc aggaccaggt gagtcgacga 180
 gcaagcccgg cggatcagcc agcgtgcttg cagatttgac ttgcaacgcc cgcatttgtt 240
 cgacgaagcc ttttggctcc tctgctcctg tctcaagcag catctaacct tgcgtcggc 300

ES 2 475 973 T3

tttccatttg caggaccagg tgggtgcgga caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcgcg	360
cctggacgag ctgtacgceg agtggtcgga ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc	420
cgggccggcc atgaccgaga tgggcgagca gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcca	480
cccggcccgc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gacgccccgg tgaagcagac	540
cctgaacttc gacctgctga agctggcggg cgacgtggag agcaaccocg gcccccctga	600
catgatgcgg cggcaacacg ctgccccctt tgtggggggc gtcaacgtct tgatggtggt	660
gctcgcttc gtgcgagcg ctaacgcgca gtgtgtacct ggcggtatct tcaactgcct	720
cgaggtgact tcctacacgc tgaacgaggt ggtgccgctg aaggacgtgg tgcctgagtg	780
ggtgcggatc ggcttcagcg ccaccacggg cgctgagttc gccgcccacg aggtgcactc	840
ctggtccttt cacagcgagc tgggtggcac cagcagctcc ggcacgggca ccggtgacta	900
taaggacgac gacgacaagt ccggtgagaa cctgtacttt cagggccaca accaccgcca	960
caagcacacc ggtgtcgacc ctccctctcc ggcaccacg tctcctgccc ctccctcccc	1020
ggtcctcccc tcaccgcgac ccccttcgcc agcaccoccg agcccagggc cccctcgcc	1080
cgccccgccc agcccccgga gccctcgccc ccgagccct gcgcccgcga gcccgcccc	1140
cccgtcccc gccccccct ctcccgcgc gccatcgct gcgcctcctt cccctcgccc	1200
accgtcccc gccccacct cgcctccgag cccggccct cctgcgcca gcccgccgc	1260
ccccccctcg ccgtcgcccc cgtcgccagc cccaccctg ccaccctccc cagcgccgcc	1320
cagccctcc cccccggtcc cgcctcacc gagcccgccc gtccctccca gccccgcccc	1380
tccttcgccc acgcctccgt cccccagccc tcccgtgccc ccagccccg ccccgcctc	1440
tcccgcctcg ccggtgccc cctcgccggc accgccctcc cctgctcccc cgggtgccc	1500
tagccctgcc cccccgtgc ctccctcgcc agcgccccct tccccccca gccccgcccc	1560
cccctcgccc tcccccccg ctccccgag ccccgctccc ccttctccg cgcctccag	1620
cccgcgccc cctccctca agccgcccgc gccaccoccg cctcccagcc caccgcctcc	1680
cccgcgccc cgtccccat tccccgcaa cactcccatg ccccatccc ctccctcccc	1740
gccccctcc ccggcgccac ccacaccccc caccocccct tcaccgtgc cgcctgccc	1800
cgttcgccc agcccagcgc ctgtgccc cagccccgcc ccgcccctcc cagctcccag	1860
ccccccct agccccctc cgcgacccc gtcccgaag cctcgctt cgcctcccc	1920
gagcccctcg cctcccca gccctcgccc ctcccagc cccagccga tcccctctcc	1980
ctcgccgaag cccagccct caccctggc cgtcaagctg gtttgggctg atgatgcat	2040
cgcttcgac gacctgaacg gcacctgac caggccccgc tccgctcgc gcatggtcgg	2100

ES 2 475 973 T3

cgagcccgac atcgccggca ccaagtgcaa gggcaacctg aagggtgga tgcccaagcc 2160
 cagcaggggtg ggtcctagga agactttgct gtttgctgcg ctgcctaggc atcatgacgc 2220
 ctgtatgacg ttgtcttttg aaggaagttc gaggattgcg ctgagttggg accgcacgca 2280
 agcaacttat ccacgccacg gtcctctccc atcttctctc tcgcagaacc ctgcgtgggg 2340
 ccaggtgtg ttctcgggtg gccgcaccgt gggctccgtc gctaactgca ccacccgct 2400
 cgcgtgagtc ggacttttga gccgcctgta ctgctgccc gtgcttgccc tcgttttgc 2460
 ggatgatctg ccgatatcca actggagctt gcttgactga ccgcttttct catccgttgg 2520
 gccctcacc ttgcctacc gcagttctgc gaccgagaag cccgcgctga tctactccag 2580
 catcgagctg gtctgtaca aactgggtgc caccctcacc cgcgtgcca tcgcccga 2640
 tgtgaccgc agecagalca gglgccclyg ctctctgacc tatggacca cccccattgc 2700
 cggctacccc actggcatcg accccaacc ctggcccaac tggaagattg ccggcgtgcg 2760
 catcaacatg ggcgcgggca acaagaagcc caagacctg attgacgcg tcggcctcaa 2820
 cctgaagagc ggttccggcg actacaagga cgacgacgac aagtccggct aa 2872

<210> 14
 <211> 4823
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Fusión scFv5-Fas1

10

<400> 14

atggccaagc tgaccagcgc cgttccgggtg ctccaccgccc gcgacgtcgc cggagcggtc 60
 gagttctgga ccgaccggtt cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga ctccgccggt 120
 gtggtccggg acgacgtgac cctgttcacc agcgcgggtc aggaccaggt gagtcgacga 180
 gcaagcccgg cggatcaggc agcgtgcttg cagattgac ttgcaacgcc cgcattgtgt 240
 cgacgaaggc ttttggtccc tctgtcgtg tctcaagcag catctaacc tcgctcgcgc 300
 tttccatttg caggaccagg tgggtcggga caacaccctg gcctgggtgt ggggtcgcgg 360
 cctggacgag ctgtacgcc agtggtcggg ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc 420
 cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcga 480
 cccggcccgc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gacgccccgg tgaagcagac 540
 cctgaacttc gacclyctga agctggcggg cgacgtggag agcaaccgg gcccccctga 600
 catggcgtct catgccgccc ccagagcgc ttccacagct gtggccactg cagcggacc 660
 gggcctcgac gactacaagg acgacgacga caagtccggc ctcgagatga aatacctatt 720
 gcctacggca gccgctggat tgttattact cgcggcccag cgggcatgg ccgaggtgca 780

ES 2 475 973 T3

gctggttgag tctgggggag gcttgggtaca gcttgggggg tccctgagac tctcctgtgc	840
agcctctgga ttcaccttta gcagctatgc catgagctgg gtccgccagg ctccaggaa	900
gggctgag tgggtctcat ggatttcggg gactggttcg cggacagact acgcagactc	960
cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaat	1020
gaacagcctg agagccgagg acacggccgt atattactgt gcgaaaaagg cgcagaagtt	1080
tgactactgg ggccaggaa ccttgggtcac cgtctcgagc ggtggaggcg gttcaggcg	1140
aggtggcagc ggccgtggcg ggtcgacgga catccagatg acccagtctc catcctcct	1200
gtctgcatct gtaggagaca gagtcacat cacttgccgg gcaagtcaga gcattagcag	1260
ctatttaaat tgggtatcagc agaaaccagg gaaagccctc aagctcctga tctatgctgc	1320
atccagtttg caaagtgggg tcccatcaag gttcagtggc agtggatctg ggacagattt	1380
cactctcacc atcagcagtc tgcaacctga agattttgca acttactact gtcaacagag	1440
ttacagtacc octaatacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gggcgccgc	1500
acacaacctc cgccacaagc acctcgagct gttccttttt acctcagccc tccaactgag	1560
cggccttgta acgttcttca acgctaccgg aaggaacatc acgttatctg cgcccagtga	1620
tcaggttggt gcttgtacgt agctggaggg cttctgatta tcaactcccc tcgaaccctc	1680
cactgacccc aacctacgac ctacaccca taecggcccc accgaaggcg ctactagcgg	1740
cgtgcgggc cctgaacctg aatcagctcc agctggtgac taacgcagtg ctcatggcg	1800
cagtgtcat gtaccacgtc ttogtgccag cgaccaaaa cgcctctgtc cctcccggaa	1860
tttctacta caacgcgttg aagtgaggcg gggcgcgag tttagaaggt tgacctgat	1920
gcgccacac ggctcgatt gcagcctttt catgtttgtg agtacctcaa tgttaggcca	1980
aaaaccgccc caacgtgcca acctacagca cggatggcag cgtcagcggc aaccagctgg	2040
cgattacgag gacggtgtcg ggcggtctgc ggtcacctc catcggcagc gacgccaacg	2100
tgatcaaggt ggacctccc aactccgggt gagagagcgc gtggctggcg gcgccaatgc	2160
gctggtcctc ttgcctatg tcaggatgag tgtcgtttcg ttgggactg gatcggtcg	2220
cgggtgatgg ggaagcggca cccggtagaa cgtgtatggg caagtggatg ggtaccgaa	2280
cagtctgcct ccgcgctca cacctcaact atctcctcta gacatgtggc attgtattgt	2340
cgtgacaac aggtccacgg tagtgacgt cgtggacgcg gtgcttctcc cgttctaccc	2400
gtcagtgtac tccgtgagtt gcagtgcaag tgccggcgca ggcgcaagct gcagaaacca	2460
aaccgggcaa ggcgatgct cggctcctgc agccaacctc atggcgcaga cctgcctttc	2520
gcagcgccga cctacatgag gcagcgaccc aacacgttgc ccaaccctg cgctgcacg	2580

ES 2 475 973 T3

tgcgccatgc aggcctgtggc ggcacacctc gccctgagca cgctggccgc gctggctggc	2640
tctgccageg ccagcctggt gtccaagctg caggtgogtg tgtgtgttga gcgggtggtg	2700
aagatttggg gggcgggctg ggcacgccgc cgttcttggg ttacggcaag tgccgtgttt	2760
tgctgactgg cggcggagtt gtgcgcgtgc tcgcacctc ctggcgcatc acagcgcccc	2820
tgatggtgtg cactgaagtg ggcattgctg tccgtcctgg gcatgttcta caggacacta	2880
cggtgttcta caccgtcttt gctccctaca atgcgtgagt tgtggttcag cacccactgg	2940
ttgtgccagg ccgacaggcc gacgttgcgt caagtgcga accgtgcgcg gctgcaagca	3000
ttgccctgac cggcttttga ttgcccagcg gctcctacgc tgacctccc tcgctgtggc	3060
tccctccctc gtgtgcacag cgccttcacg gccgcctgg cccctcccg cctcaacacg	3120
acgattgcgc agctggcggc gcagcccgcc ctgctgcagt ccatcctgtc gtaccacgtc	3180
gtgcccggcc tgtacaacgc ctctcgttt tccaccacac ccatcaccgt caccacctg	3240
acglatggcl tcgctgcalg calgcgcacc cagcgtgtgt gcgccaccgt qcagaqqcag	3300
gcctcaacct tcagatcagl ctgatcagtt tgaccagttg cattccgaca cagcagatg	3360
ccctggcatg cctcaatgoc ccgctccgca gtggccagaa gctgacgctg gtgaaggacg	3420
gcacttcgct gtccgtgaag acggccgacg gcatgacggc caacctgctg caggcgcgcg	3480
acctgcogtg cggcttcacg gaccagtgag ttggctcgcg gagtgaaccg catagcaagg	3540
gacaaggact cgtggcatcc cgttgttcag gatgggtttg caccggcgtg ggagcccaa	3600
atcccaacat gcacagctaa cgcatttcac actacacgtc caacctgtca ggggcacgtt	3660
ccgcgcgacc gtgcacgtga tcgacaaggt actcgtccct cccctgtta cctcctggc	3720
tgcggcgcgt gccctgcgca ccgacgtcaa cacactgctg gcggccgtca aggcggaggg	3780
gtcctactcg gctgcgatca acaggtgact tgcggcaacc ggcccggtta caaacgctat	3840
gcgcttactg ccgcttctcg ggcacatact gcgtccattt gactgcatta cgaaggactg	3900
gacttaccoc agaattgttc cctgcctgt gctgcatgcc ctgaaacct cagcaccaca	3960
ttcaccggca cgctcttggc gccatcgac tcggcctca cggcgtgct ggccggcaat	4020
ggcagcatca gcgcgcgca gctgctggc aacaccacgg cgctgaagaa gatcctggac	4080
gtgagtgctc gtgctatgca ggcgtcctca ggccacagac ctctatgtac agccagcgtg	4140
cctgaccttg tgggtcttct gqctgtgttc aggcgcacgt ggtcacggyg tcygtgctga	4200
cggtgccggg tctcauccac ggcagaaca ttaccaccag gtgygggcat taqccattgg	4260
gcttgaggtg tccccacat tgggtggtg ccgctgcggc ttttggcat tatgctgagt	4320
agaatgctat gctcttggct tgatctttgc gttgcatcat gtatcctgtt cgcagtggcg	4380
gcgctacgat cacggttgtc aagaccgaa ccacgaccca gctgaagctg ggcaacagcg	4440
tggctacgct ggtcggggcg gaggttgcga ttggcagcag gtgggtgcac ctgacctctt	4500
cattgccacc ttctgcagc gctgatgatg gcttctttgc gacgttatcg acgtgcttaa	4560
aaacgcaaca caacaagtgc catcgccgcg agcctgcctg ctgtgttatg gtgtcaacgc	4620
gccccatacc ccatgccatg cccctggtg ttgacgcgc gacgctcctc gtcactgacg	4680
gtgtcctggt gcgctccggc gtttccaccg tgacctcggg aggcgggtggc ggccgcgacg	4740
cggcaactac gccgtccttc gtgctcatgc tgtggagcgt tgtggcggca gcgctgctgc	4800
tagcattcca gcgctgcag tag	4823

<210> 15
 <211> 9392
 <212> ADN

ES 2 475 973 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fusión lectina pomatia Nit-2A-H.

5

<400> 15

tctagatatg cacgccaggc ttgcggttga aggggcatca ggctcgaggc gagacgtcga	60
gggcgtgggc tctgtatggc tgggtaacgg tacgtataat tccaggtaca agctagagca	120
gacggtggtg agaagcatta gaagcattgt cccgagtgty gtggctagaa tcccggccca	180
cgaatcacag tgaatgggta catgtacagg tgccccgcca gccccgctc ctctgctgcc	240
tctgatgect catgcaaaaa gtcttgacgc ggcgccctca catccccgtc cgggtaatct	300
atgagtttcc cttatcgagc atgtacgcga tagtggacgg ggctcaggtt ggggggtggg	360
tgggtggggg gggcgcttct tcagacaccc tggaggggtg gctagaaaag cggccgcgcg	420
ccagaaatgt ctgctgccc tgtgcaataa gcaccggcta taltgctcag cgctgttcgg	480
cgcaacgggg ggtcagccct tgggaagcgt tggactatat gtaggggtgc gactgacccc	540
gcgcgacttg gagctcgatg gccccgggtt gtttggggcg tccgcctctc gcgctattct	600
gagctggaga ccgaggcgca tgaaaatgca ttgcttcca taggacgctg cattgtggct	660
tgaagttca agggaagggt tcaaacgacc ccgccgtacg aacttttgtc ggggggcgct	720
ccccggcccc ggctcttgtg cgcgcattag ggcttcgggt cgcaagcaag acgatacagg	780
aaccgaccaa tcgatagtct tgtgcgaccg tgcacgtgtg cagcaatagt taggtcgata	840
accacgttga acttgcgtct ctcttcgtgg gcctctctgc ttggtgctcc acttcaettg	900
tcgctatata gcacagcgtt gaaagcaaa gcccactaa tacagccggg ctcgagagtc	960
cgtctgcggt tgcatgttg gccaaagggt gctttgtagc caaagccata cacgaagctt	1020
cacttgatta gctttacgac cctcagccga atcctgccag tatgaccgtt gccgagcagc	1080

ES 2 475 973 T3

ccgtggcaact cgtgcccagc ggcaaggtgc aggcgcccga cgctatcgtc tgcgaagcgg	1140
tgcagctcgg cgctccgtat gagcctccgc tctcgcccga ggatgccgac tggtcgcagc	1200
acgtttcttc ctcagctgtg gacaagcgcg accaggacac gcccgacaac tgggtgcggc	1260
gcgacccccg catcctgcgc ctcaccggcc ggcaccgcct caactgcgag ccgcccattg	1320
ccgtgtctcat gcaggtgagg gggatttgca ggggggaggc gagcttgagg ttaggttagt	1380
gaacaaagag cagaggaggg aactgacagc catggctcga agctggctgg gttgataatt	1440
tagggagaat tatgcggcgg tggttgggcg tgggtggggg gtggcacggg tttgaggcct	1500
ggggcctggg gcgaggggcg gggtaacgg gtgacggcag gctgggcgta cgtggagacg	1560
cgtcaaccca cagtcagct acagcctcgt cctcactgac catctcccgc tctcctcttc	1620
ccctccaatc ccccaaacca accaaccta cacaaaccaa cagtaacggt tcatcacgcc	1680
gccggcggta cacttcgtgc gcaaccacgg cgccgcggcg cgcacccgct gggatgagca	1740
ccgcatcgag atcaacggcc tggtaacaa gccgttgact ttgaccatgg acgagctggt	1800
ggcgtgccc tccgtcacct tcccggtagc gctgggtgtc gctggcaacc gccgcaagga	1860
ggagaacatg ctgaagaaga gcattggctt caactggggc ccttgtgcca ccagcaccac	1920
ctactggacg ggcgtgcggc tgcgcgacct gttgcagcac gccggcatca aggtgtgtgt	1980
gtgtgtgtgt gtatagctga cagggggtg taataaccag cccaaaactaa accaaaaccag	2040
tgggggggtg aatgggtgat gtgcccgagc ccaataagtc ccaagagtca aggagtcgtc	2100
acccaaccca gaaatgcagc gcgagctccg cgtataaccg tgggaagagq ggggaacgag	2160
agagggacga gggatgggga gggatggcag ggagggatgg gaggaagga aggaggggag	2220
gagggaaaga gagcgcctgt ggtggtgatg gcgggggcga ggaattgcaa gacaggggct	2280
tgatgtggcg tgggtgtgagt gcatgtatgc ctgtgtggga acgcaagcac atttccctga	2340
tccccgccac cgccttgct tctcccatt cccacgcctg ctgctgcaga cgcgggcoga	2400
gggcgcccgc ttcgtgtgct tccgcggccc caagggcgag ctgccacgtg gcgaggacgg	2460
ctcgtacgqc acctctctga cgtacgcaa ggccatggac cccgcctcgg acgttatcat	2520
cgcatacaag cagaaccaca ggtgtgtgcg tgtgcgtatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	2580
tgtgtgtgtg tgtctctgtg tgtgcgtgtg tgaagagcg aaaggcaaa aataggctgt	2640
gcgtgtgcgt gtgtgttcga gcgcacaagg caaacactag gctgtgtgtg tttgtgtgcg	2700
cgtgtgtcgg ggggcggggg cgcggggagc gcagcgggag gttggcgcta ggctgggcac	2760
tgggtcgcac gggtcggagc cctggagctc gtccgaatgg cgatggcgac ggtatgcgaa	2820
gattgccgca cagaatagcc gtcgtgccgt gctgtctcagc ttcctcacc cctccctccc	2880
tccctccccg ctctccccg cccctccccg cctgctgctt gctgctgcg caggtggctg	2940

ES 2 475 973 T3

acgcccgacc	acggcttccc	ggtgcgcac	atcatcccgg	gcttcacgg	cgcccgcatg	3000
gtcaagtggc	tgagcgagat	caccgtcatg	gacacggagt	cgcaggtagc	tgggcgtgtg	3060
ggtttcgaga	atgcttttaa	ggctaacaat	gcgaagccat	caagccagcg	agcacaacgt	3120
gtgtgtatgt	agttgtctgg	gtgtgtgcgg	gcgaattgat	tcaggccgat	gggctggcat	3180
gtagctccca	gcctggcacc	aaagcttgtg	gggcgtaact	atgcttacac	gcttcggccc	3240
taccacgata	cccttgtaac	ctgtgcggcc	actccctctc	catccccccc	ccaaaacaca	3300
cacccctaca	cacacagaac	ttctaccact	tcatggacaa	ccgcgtgctg	cccagccacg	3360
tggacgagga	gctggccaag	aaggagggtg	agcgcggggg	ggaggaccgt	ggcgtgtgtg	3420
tattggagag	cacagggtag	gaaacagggg	aagatttccg	cagaaatcct	gtgtgtgtgc	3480
atgtgaccgc	catcattcga	accctgttca	tccccttccc	gaagtccccg	tcctgaaact	3540
cgccgtgtac	acgcgcgcag	gctgggtgga	caagcccag	ttcatcatca	acgacctcaa	3600
catcaacagc	gcgatggctc	ggccctggca	cgacgagctg	gtcccgtctg	acgccaaccc	3660
gccctacacc	atcaagggtt	acgcctacgc	cggtgagcag	caacaacagc	gataatgaca	3720
gcaagcgggg	gcagcgagct	gcctagcgag	cgagtgagag	agccaacgct	gttggtttcg	3780
ggccgttttg	tcgtggcact	ggcaggcatc	ataccgtaca	tgcgatttag	gacgtgtgga	3840
acgggacacg	tgtgagcggc	tagttaagta	acggcaggac	tgaagatgag	gatgacgaag	3900
tatatttaag	ttatlttctg	gcgttggctc	gtgtcgtcat	cctcatcatg	tgaggcgggc	3960
ggccgcaaga	tcattccgctg	cgaggtctcg	ctggacgacg	gcaagacctg	gcgcctgggc	4020
gacatccagc	gcttcgagga	gccccaacgag	taoggcaagc	actggtgctg	ggtgcactgg	4080
acgctggagg	tgaggcggcg	gagcgaggag	gagtggggcg	ctgtggggca	aatgggcgat	4140
gtcggttggg	atggcgggat	gggcctttgc	gtccctccag	ccccacggac	ccactgcttc	4200
gctctgcccc	ccccccaaa	aaaacacagg	tgaacacggt	tgacttctctg	tcggccaagg	4260
aggtgctgtg	ccggccctgg	gatgagacca	tgaacacgca	gccggcgggtg	atcacctgga	4320
acctgatggg	catgatgaac	aaactgctact	tccggtgagc	gtgtgtgtgt	gcgtgtgtgg	4380
aaggggggga	ggcggcgatg	agggaggcgg	cgagaggcgc	ccttttgtgc	aatgttcagc	4440
atcgcagcgc	cgctcatcgc	atttccccga	acacctgcgt	gacagccctg	gttccacacg	4500
tcggccccgc	cctccccacc	ccatcccact	aaactaatca	tgaatgtccc	ccacgtaaca	4560
cgcgagcat	caagatccac	ccggagggtg	acccagccac	gggcgtcatg	ggcctgogct	4620
tcagcacc	ggccccgtg	gagctggggc	acaagggcaa	catgggctgg	cgcgaggagg	4680
acaacctggt	ggcgcaggcc	gtggcggcgg	cgcgcgacgg	cgaggcgcg	gcggcggcac	4740

ES 2 475 973 T3

cgccgcccgc gcccgcggcg gcgctgctgg cgaatggcgg ccccaagcag tacacgctgg	4800
aggaggtggc ggagcacgcg agcgaggaga gctgctggtt cgtgcacgag ggccgggtga	4860
ggagagcggg tggcgtggtg gctggtctgg tggctggtct ggggctaggg gtttgtggtt	4920
gaggtttagt gaagggcgag aggcgtggtt gtgggtacgt gcgtgcccag cagctgcacc	4980
ccaaccctg ctagcgtgca cacgaaacc tgaaccacc tggaccccag ctttctaacc	5040
cctttcacc cccccctcc ccgccctcc ctcctctcc aggtgtacga cgccacgccc	5100
tacctgaatg accaaaccggg tggcgcggag tccatcctga tcaactgcgg cgcggaacgc	5160
acagacgagt tcaacgccat ccacaggtgg gtagggggcg agaactgtg tgtgcatgtg	5220
ttttgtcgt gtgtgattgg tgttttggg gcgtgtacga gagaggggac gttttgcggg	5280
gctaggatca ggcgcaggcg tgtataagg gtcccgcgat ggcgtggcat ccaaccacc	5340
gtcccataca caccacgcac accaccgtcc ccatcccatc tcaccccatc tccccactg	5400
cgccccaca tccccacac acagctccaa agccaaggcc atgctggccc agtaactacat	5460
cggtagcctc gtggcatcaa aaccagcaac cgccaacggc acggcaaccg ccaacggcaa	5520
cggcacggca actgccaac gcaccgcggc ggcggcgcg ccgcgcgacc ctctggttgt	5580
gctgacgggt cgcgccaaag tgaagctacc gctggtggag cggattgagc tcaaccgcaa	5640
caegcgcata ttcgggttcg gcctgcctc gcgggagca cgcctcggg ggtggtgtcg	5700
cgcgcgttat gataactatg atacggtagt acgcacgtct tgctgcctt gctgagtgtg	5760
tgccttgatt tgtgtggggg aagggggcaa gaacaagagc agccagcaga aggggaagga	5820
gcgggctgac ttcgtgtcgg ttgcgcgtcc gcggcaccac tcaactggca ccaactcactg	5880
cacctccac cccctccct ccccgatgc gcaggcctgc cgttgggcaa gcacgtgttc	5940
gtgtacgcgc aggtgggcgg cgagaacgtg atgcgcctt acacgcccat cagcggggac	6000
gaggagaagg gccggtgga catgctcacc aaggtgcgtg tatgtgtgtg tgtgtatgtg	6060
tgagggacgt gtgtqgcct gtgtgtggg gtgggacgt gtgtgcatgt gtgtgtaggt	6120
gttttctggt gcgtcattca tctttgtac cgtgtgtgcc cctgaccgc gccatgcccc	6180
acaccccaca atccccact gaccccacac accgggcgag cacgcgtcct accccgaggg	6240
cggcaagatg agccagcatt tcgactcgtc cgccatcggc gactgcctgg agttcaaggg	6300
gccctgggg cactlclgt acaacggcg cggaaactac acgctcaacg gcaaggtgcg	6360
cgcaacagga acggggcgtc ctgtagccgc gagaatgagt aagcctacca cacaagcaca	6420
tttaaagtca cacacattgt ggtgagcttc ttacggcaca tlgtcacaca cglagatag	6480
ctaacacaca cacacccta cctccctgca ggtgaccaag cacgccagtc acatgtcgtt	6540
tgttgccggc ggcacgggca tcacgcctc ctacgcgtc atcaaggccg cactgcgcga	6600

ES 2 475 973 T3

ccccgaggac aacaccaagt gagcagcggc ggcggcgggg ggaagcggga gaggaagcgg	6660
cctcattgcc gttggctggt agctgaactga tgacacgctt tgctgccgcc gtatcacagt	6720
gccatagcat agcaaggcag tggatgggca ttggtacag ccagggacta aagggccaca	6780
cgcacgtccc cggcacatac acccggcccc acacctgtgt ccatcatcca tcacgcacac	6840
ccactctgac accaacacac caacacacac accccacaac ccccttccca cctgcaggct	6900
ggcgtgctg ttgcgcaaca cacacgagga cgacattctg ctgcgcgagg agctggacga	6960
gctcgcaaac aaccaccccg agcgttccg gctgtggtga gggcgcaacc cgggggccac	7020
acgtacggcg cgcgcagccg cagctttggc ttgccttcc gtcccagcct gagccaaccg	7080
tcaacgaacc aaccaacacc gaaccctcc cccacccct cccgccatcc tcaggtacac	7140
ggtgtcacag cccaaggcag cggcgacctg gaagtacgac gtggggcgtg tgagcaagga	7200
catgttcacg gagcacctct tcgccagcac gggcgaggac tgctcagcc tcatgtgcgg	7260
gccgcacggc atgatcagc actgctgcgt gccgttccg gaggccatgg gctacagcaa	7320
ggaccgccag atccagttcg ccccggtgaa gcagaccctg aacttcgacc tgctgaagct	7380
ggcggcgcac gtggagagca acccgggccc cctcagcag tgcgccctga agaccattgc	7440
tttcagcgcc gccatcgacc gcgagcagac gtttgacgcc aaccaggtgg tcatctacga	7500
catcgtgatt acgaaccacg gcaacgccta cgataactcc accggcctgt tcaccgcgcc	7560
ggtggacggc atgtacagct ttcaactgaa cctgctcacg attaaggaga aggagggctg	7620
gctggagctc gtgcacaacg gtcagctcaa ggtgagcgtc tacgcgaagc aggacagcac	7680
gtacgattcg tcgagcaact cggtcatcat caagatgaag gagggtgatc ggggtaacgt	7740
gcgggcccac aagaagtcgg gtctgttcgg ccgcgacgac gagctgtaca acacgttctc	7800
cggccacttc ctgtccggcc tgggcaccgg caccggtgac tacaaggacg acgacgacaa	7860
gtccggcgag aacctgtact tccagggcca caaccaccgc cacaagcaca ccggtgtcga	7920
ctagggatct atcgctagag attgtggcca cggttggatc atgcgaccag caggattgga	7980
tccgaatcca ggcattctgg cggatgccag gccaggggca ggggcagcgg tcgtgggagc	8040
gtgtgtgagc cggataaggg ctggcacagg ccacggccgc agcggccttt tgtgcagttt	8100
gacgacggaa gtgtgcgtct gtgtggttgt gtgtgagagc taggcaggac cgcagggtea	8160
gacagagtgc gcccggttg gctgcggcgc actgggacgc gttggcagtt taaaacctgc	8220
gctgagggga caaacgagtt tggcaacagt aggcagttaa aagatagaat gtgtaggtea	8280
gtttcccagt gggcaaatga gttgtgcaag cctgcaaacg gcaggaagca tggcaaggat	8340
attactgatt gactgcagca ggggatagca gtagtggcac agcagagtgc ccgagagagt	8400

ES 2 475 973 T3

gtgtgcacgt gctagttttg gagtcaggca ccgcccgttga gatgatgtat tgatgacgca 8460
gcatttcatg tgacataggg aggctttcca tgcggttatt atattatgtc aggaaagtgc 8520
ctgacagcgt ttagcgcgtg gggagaagta cgaccctccg tgggctgaac ccacgtagg 8580
gcgtggggtg gtcaggaggg tgggtgccat gcatgaagca gagggccggg gcgttagccc 8640
gttttgggtg gagcttgttt gatgcaatgc gatacataat cataaggggg ttttggcgcg 8700
tgagagtgcg acctgtgtat ggcagcacgc catcggtgcc aaccggcga ggtgcaggag 8760
gtgcaggtaa agctacatat agacaacccc tgccgcacag ttgtaaatta agcaagcgac 8820
ltgcatlgtg lccatcaclt tgtgcagcag ggcaggcaag ggcaggtyct gccatgggct 8880
ggcacggcgt ggggcaacaa gggggccttag actcccaggg gcgaccagtc gagccagggc 8940
cgcaaggacc atggagagct gctagtgcc caggcggcc aggccgcaac agcagttggg 9000
cggccagatg gcagaccgcy aatgggagcc cttggctgta agtcgggctg cgagagagat 9060
ttacctcgac tgtggccggg aagagggggc gctgggcaag agtcggacta gggagtgcgc 9120
gactgaaacg cgcggggacac tgcgcgggga cacaggcgcg gtcaaagcac ctgtgtacct 9180
cgcgagtaga tagcagttta ggcgatgtcc ttgataatgg tggagctctc agcgacaaa 9240
gaagcgactt cagagcgacc ggcccactaa cggtcacacc cgaacggccg ctccctcgtt 9300
ttcgtgcgca cagccgctat agaagtcgca agtagcaaac actaatgttg cttttacagc 9360
gacaagtga acgggttgg tgaagagaat tc 9392

<210> 16
<211> 1431
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Fusión LppOmpA-scFv5

10

<400> 16
atgacatgtg aattcatgaa agctactaaa ctggactgg gcgcggaat cctgggttct 60
actctgtgag caggttctc cagcaacgct aaaaatcgatc aggaattcc aggcaacccg 120
tatgttggct ttgaaatggg ttacgactgg ttaggtcgtg tgccgtacaa aggcagcgtt 180
gaaaacgggtg catacaaacg tcagggcgtt caactgaccg ctaaactggg ttaccacaatc 240
actgacgacc tagacatcta cactcgtctg ggtggatgg tatggcgtgc agacactaaa 300
tccaacgttt atggtaaaaa ccacgacacc ggcgtttctc cgtctctcgc tggcggtggt 360
gagtacgca tcaactcga aatcgctacc cgtctggaat accagtggac caacaacatc 420
ggtgacgac acaccatcgg cactcgtccg gacaacggta ttaactcgag cagcgtgcct 480
ggcgatccgc gcgtgcctcg cagctggacg gagcccttcc cgttctgcgg tacaggcgac 540

ES 2 475 973 T3

tacaaggatg atgacgacaa gtcgggagag aacctctatt tccagggtca caaccaccgc	600
cacaagcacc ctaggatgaa atacctattg cctacggcag cgcctggatt gttattactc	660
gcggcccagc cggccatggc cgaggtgcag ctggttgagt ctgggggagc cttggtacag	720
cctggggggt ccctgagact ctctctgtca gcctctggat tcacctttag cagctatgcc	780
atgagctggg tcgccaggc tccagggaag gggctggagt gggctctcatg gatttcgggg	840
actggttcgc ggacagacta cgcagactcc gtgaagggcc ggttcacat ctccagagac	900
aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga cacggccgta	960
tattactgtg cgaaaaaggc gcagaagttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc	1020
gtctcgagcg gtggaggcgg ttcaggcggg ggtggcagcg gcgggtggcg gtcgacggac	1080
atccagatga cccagctctc atcctccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc	1140
acttgccggg caagtcagag cattagcagc tatttaaat ggtatcagca gaaaccaggg	1200
aaagccocta agctcctgat ctatgctgca tccagtttgc aaagtggggt cccatcaagg	1260
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa	1320
gattttgcaa cttactactg tcaacagagt tacagtacc ctaatacgtt cggccaaggg	1380
accaaggtgg aatcaaacg ggcgccgca catcatcatc accatcacta a	1431

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de floculación de un organismo fotosintético no vascular, que comprende expresar un ácido nucleico exógeno que codifica una primera fracción de floculación como un componente de superficie celular de un primer organismo fotosintético no vascular; y poner en contacto dicho organismo con una segunda fracción de floculación, floculándose así dicho organismo.
- 10 2. Procedimiento de floculación de un organismo fotosintético no vascular, que comprende poner en contacto dicho organismo fotosintético no vascular con un segundo organismo, comprendiendo dicho segundo organismo un ácido nucleico exógeno que codifica una fracción de floculación que se une a un componente de superficie de dicho organismo fotosintético no vascular, provocando así la floculación de dicho organismo fotosintético no vascular.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la transformación de un segundo organismo con un segundo ácido nucleico exógeno que codifica dicha segunda fracción de floculación; y la expresión de dicha segunda fracción de floculación.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha primera fracción de floculación es una proteína de unión a hidratos de carbono o un anticuerpo.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha fracción de floculación es una proteína de unión a hidratos de carbono o un anticuerpo.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha segunda fracción de floculación es una proteína de unión a hidratos de carbono o un anticuerpo.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicha proteína de unión a hidratos de carbono es una lectina.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha proteína de unión a hidratos de carbono se selecciona de entre el grupo que consiste en DC-SIGN, dectina-1, dectina-2, HECL, langerina, layilina, mincle, MMGL, E-selectina, P-selectina, L-selectina, DEC-205, Endo 180, receptor de manosa, receptor de fosfolipasa A2, sialoadhesina (siglec-1), siglec-2, siglec-3, siglec-4, siglec-5, siglec-6, siglec-7, siglec-8, siglec-9, siglec-10, siglec-11 y galectinas.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que (i) dicha segunda fracción de floculación interactúa con dicha primera fracción de floculación, y dicha segunda fracción de floculación es una lectina, un hidrato de carbono, una proteína, un metal pesado, un floculante catiónico o químico; o (ii) dicha segunda fracción de floculación está unida a un soporte sólido.
- 50 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que (i) dicho anticuerpo se une específicamente a un antígeno de superficie celular; o (ii) dicho anticuerpo es un anticuerpo univalente, multivalente o polivalente.
- 55 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que por lo menos uno de dichos ácidos nucleicos exógenos comprende además un elemento regulador, comprendiendo dicho elemento un promotor constitutivo, un promotor inducible mediante luz, un promotor sensible al quórum, un promotor sensible a la temperatura, un promotor sensible a las sales o un promotor sensible a la concentración de nitrógeno.
- 60 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que (i) dicho segundo organismo es de la misma especie que dicho primer organismo; o (ii) dicho segundo organismo es de una especie diferente a dicho primer organismo.
13. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que por lo menos uno de dichos ácidos nucleicos exógenos comprende además un elemento de direccionamiento que permite que dicha primera fracción de floculación, dicha segunda fracción de floculación, o ambas, sean dirigidas a una superficie externa de dicho organismo.
14. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que por lo menos uno de dichos ácidos nucleicos exógenos comprende una secuencia que codifica un elemento de anclaje que permite el anclaje de dicha primera fracción de floculación, dicha segunda fracción de floculación, o ambas, sobre una superficie externa de dicho primer organismo, dicho segundo organismo, o ambos.
15. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha fracción de floculación es secretada por dicho segundo organismo.

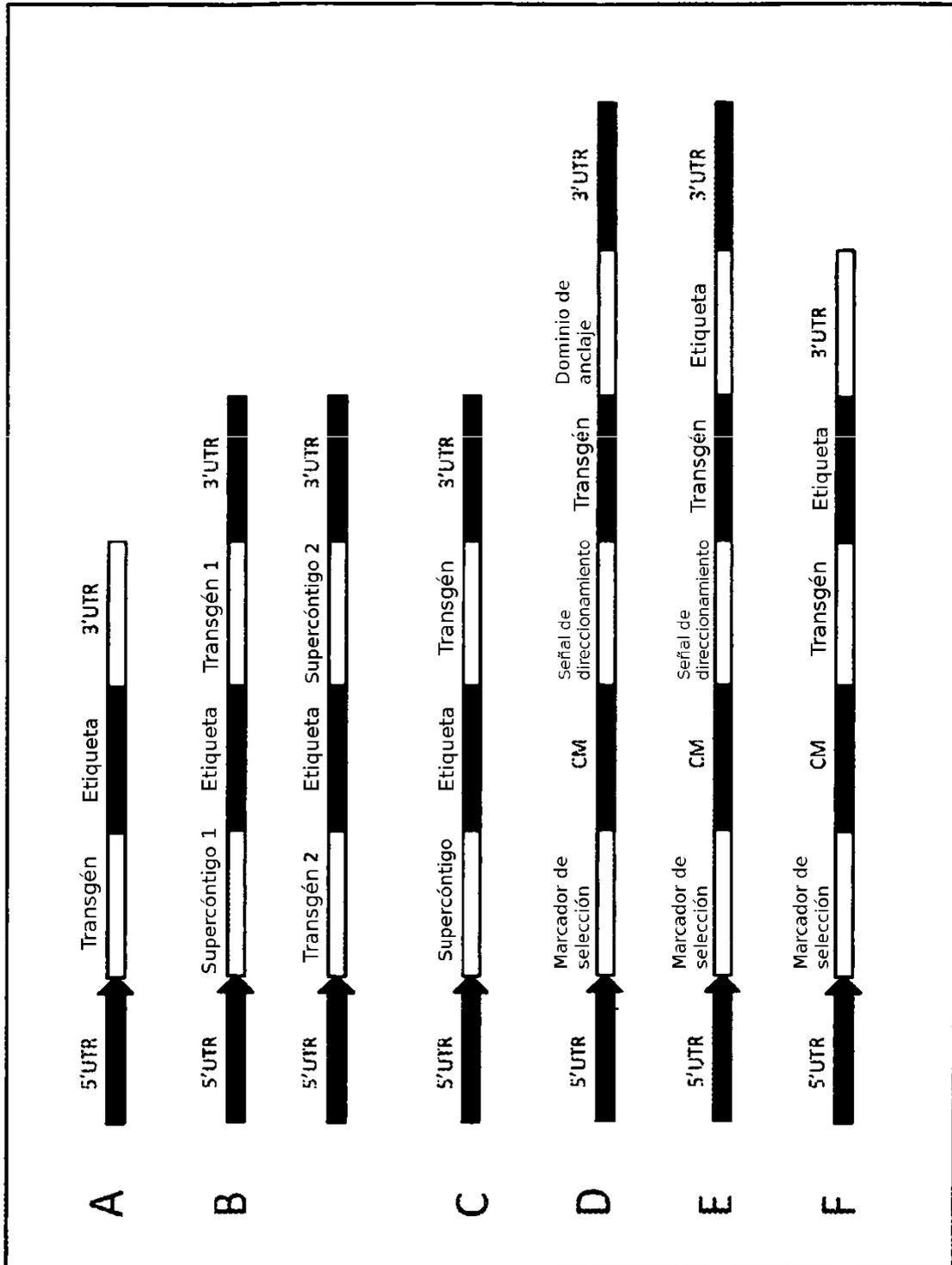


FIGURA 1

FIGURA 2

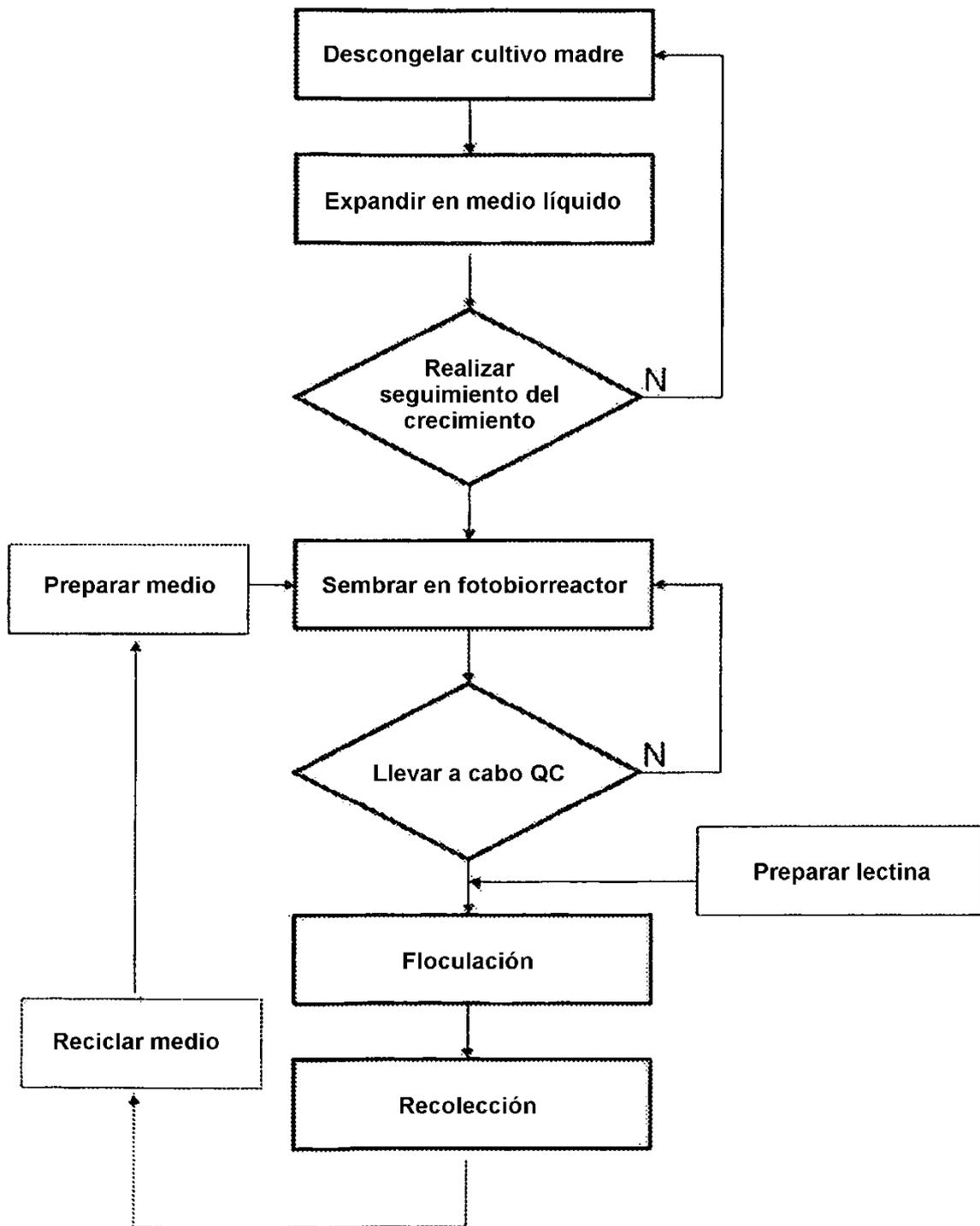


FIGURA 3

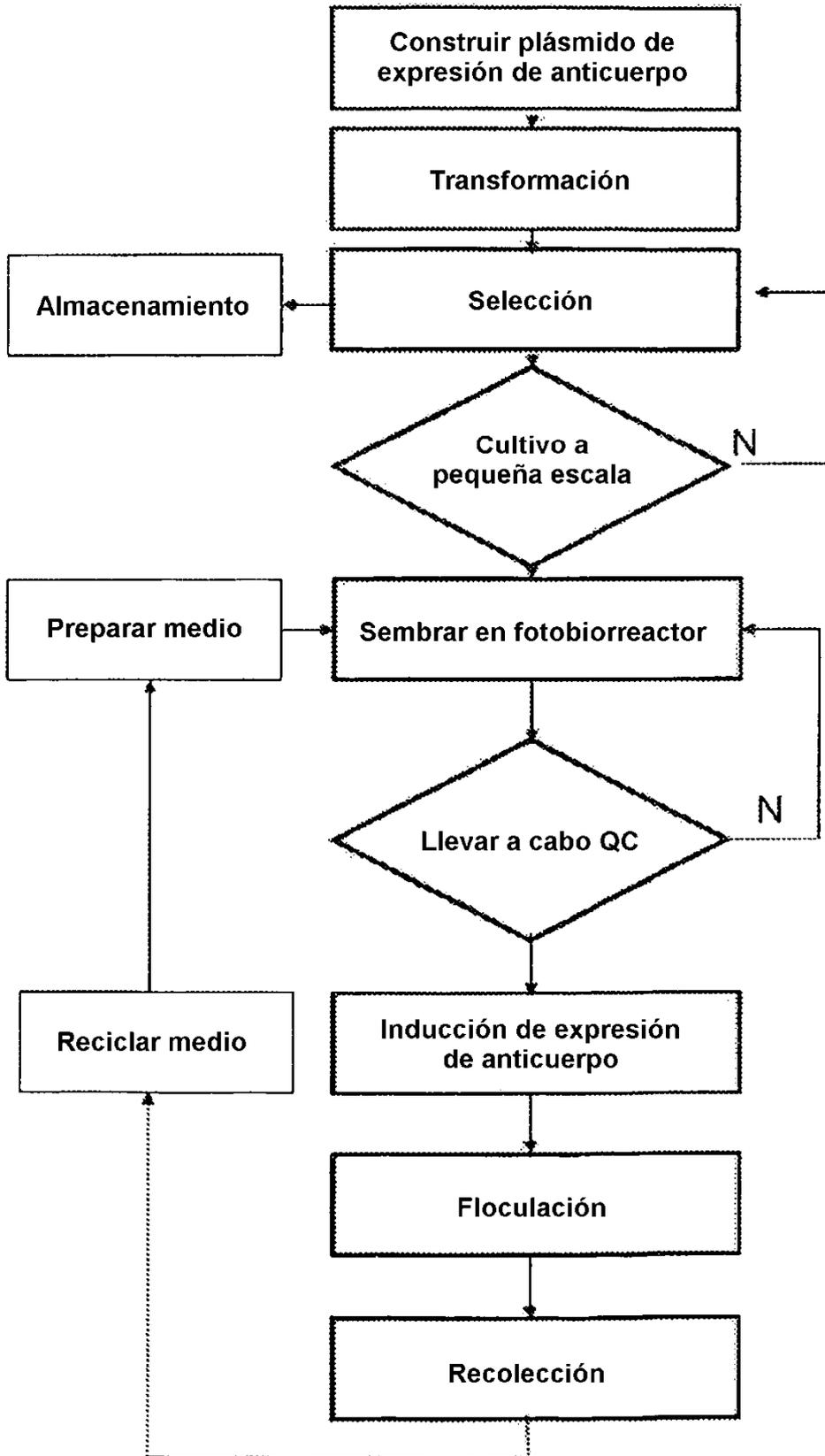


FIGURA 4

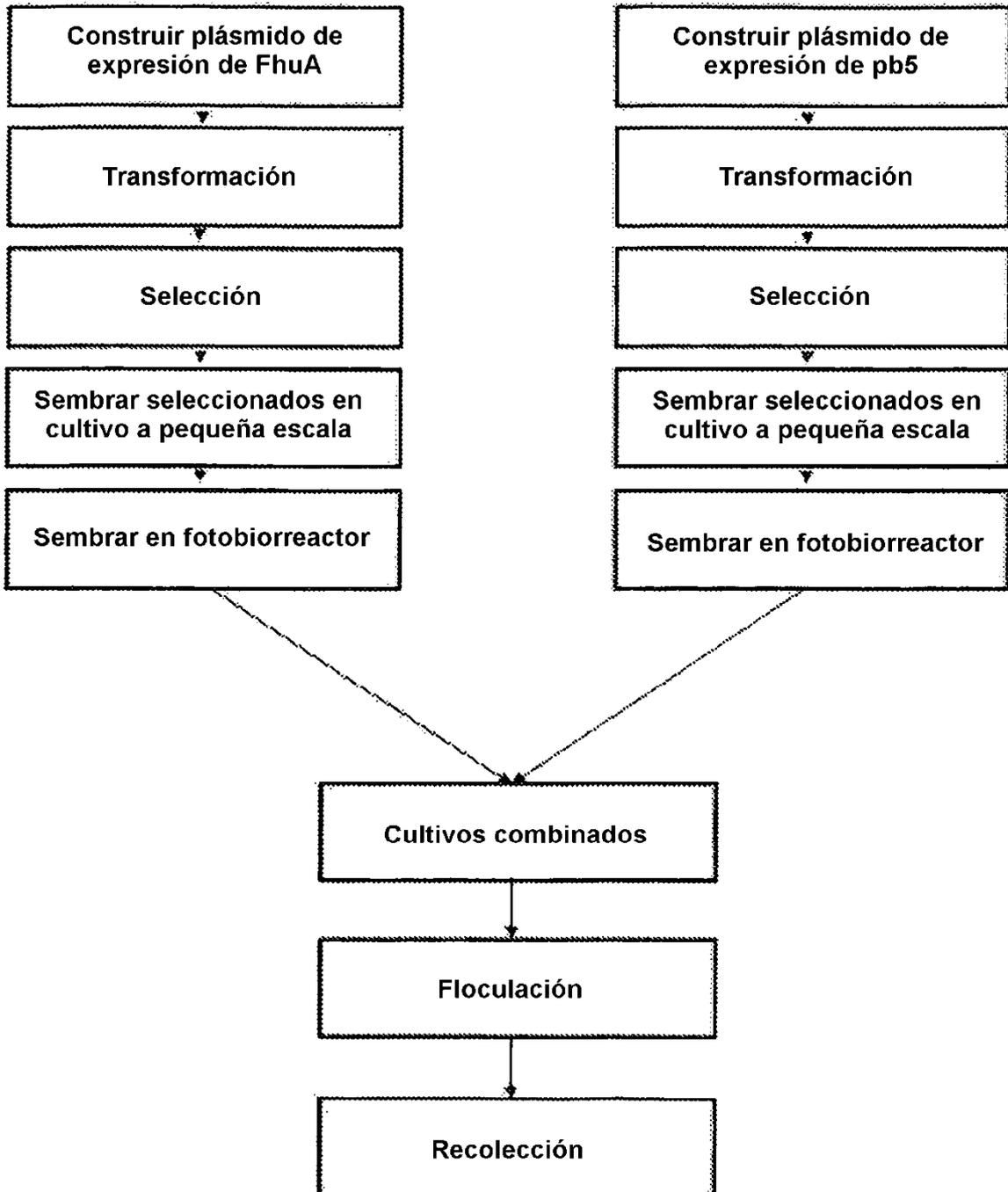
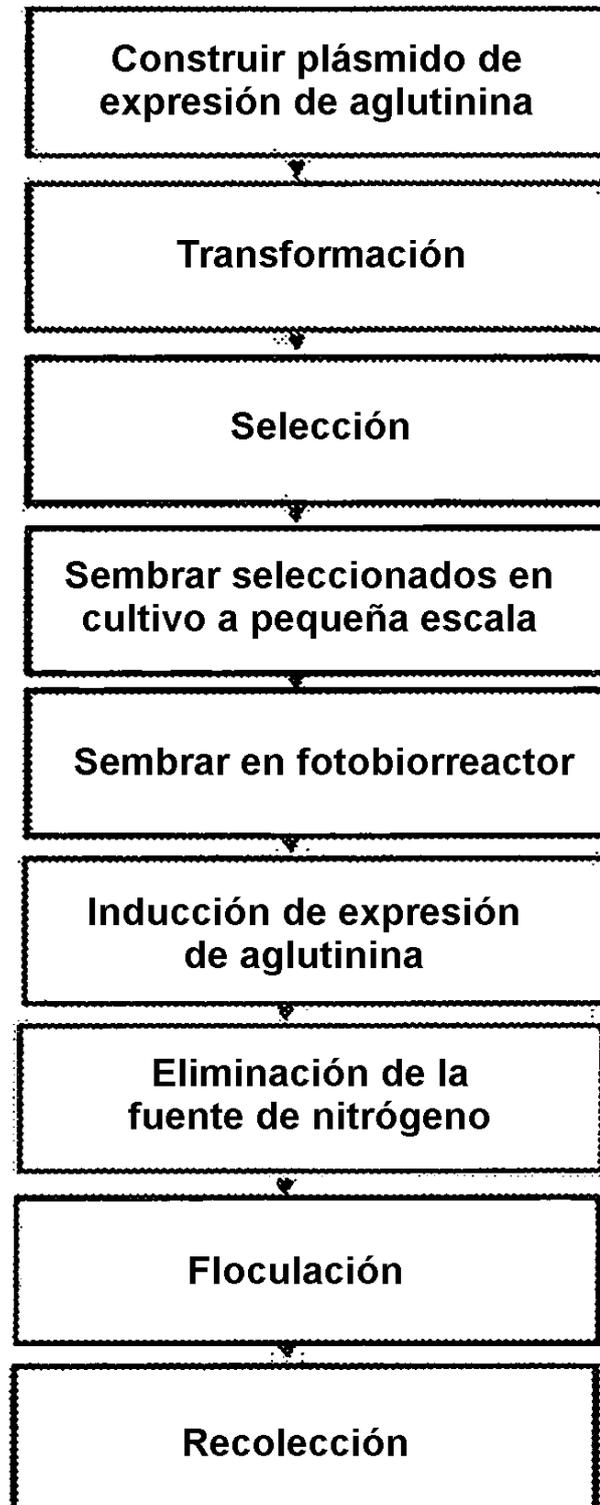


FIGURA 5



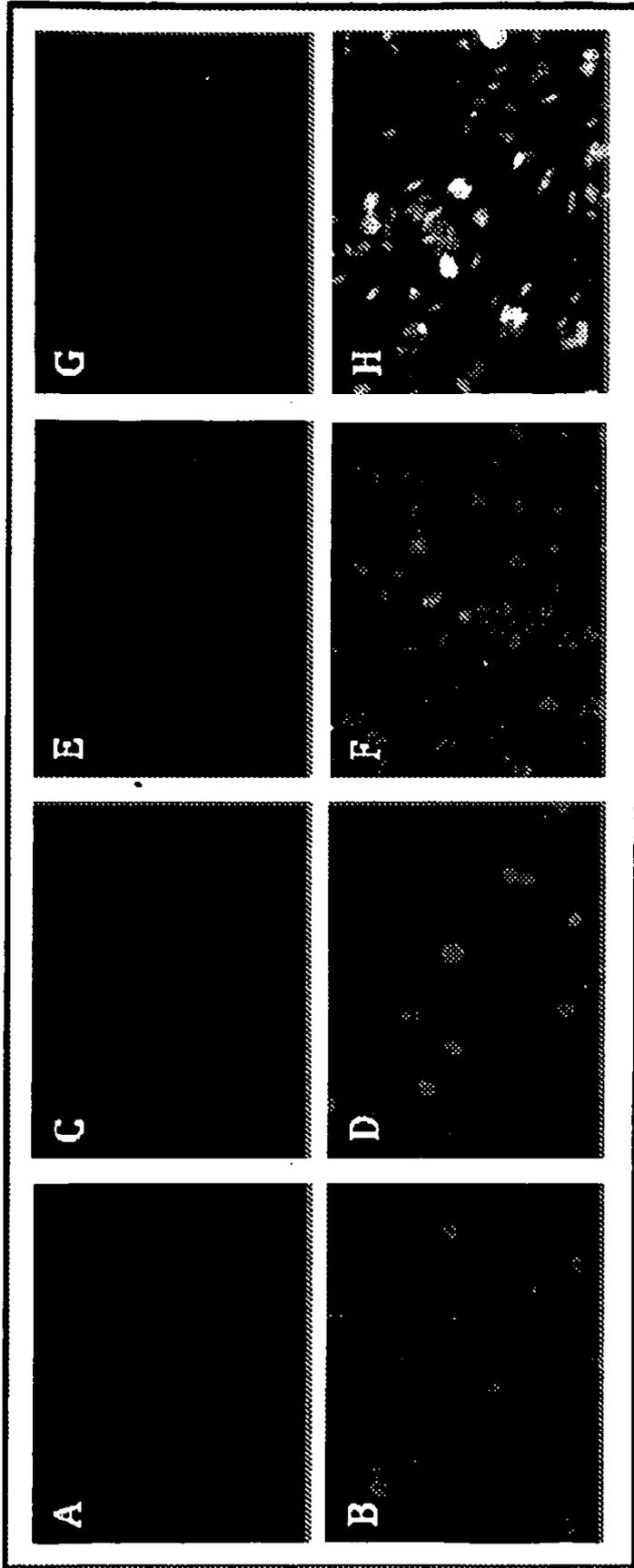


FIGURA 6

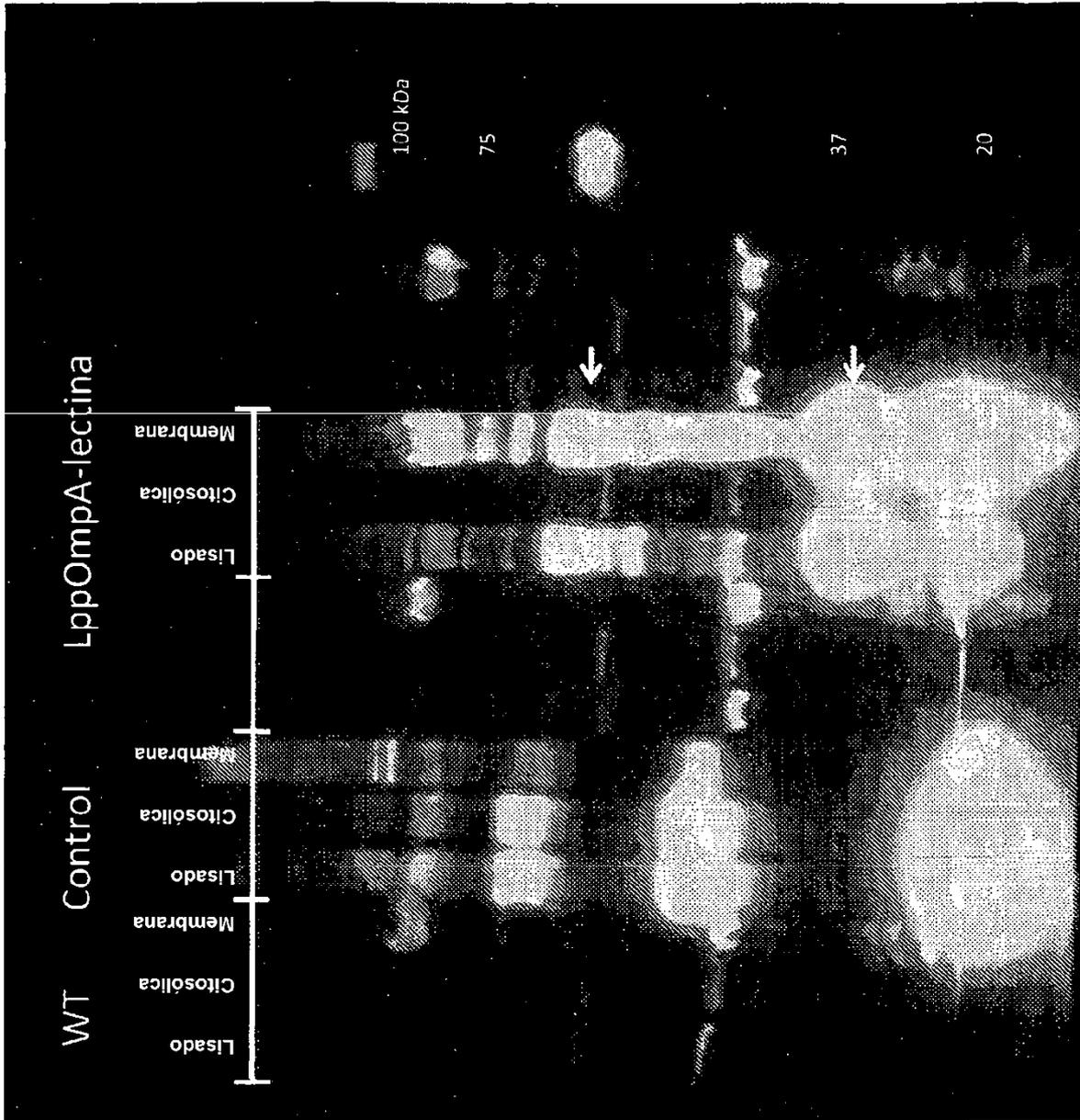


FIGURA 7

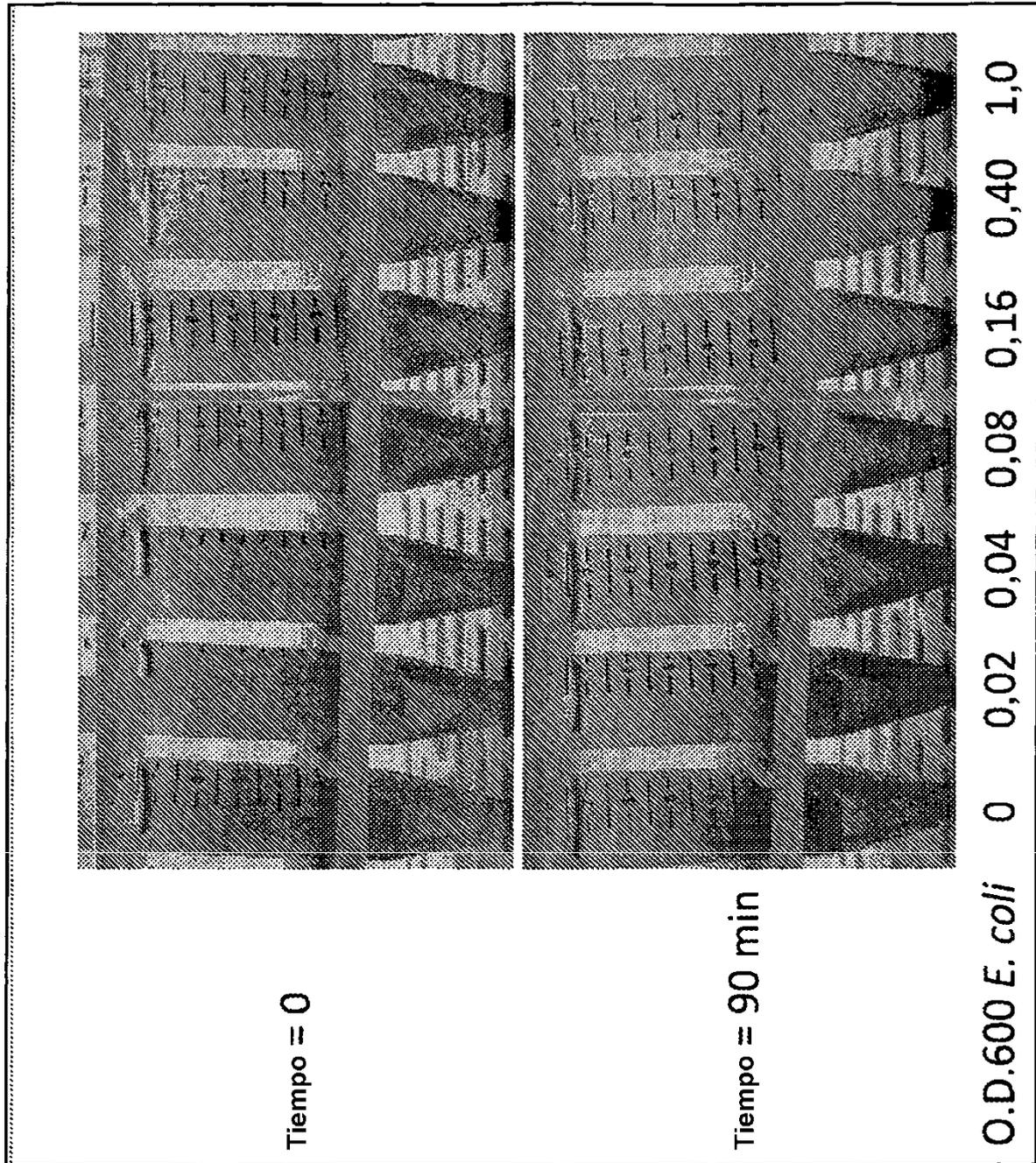


FIGURA 8

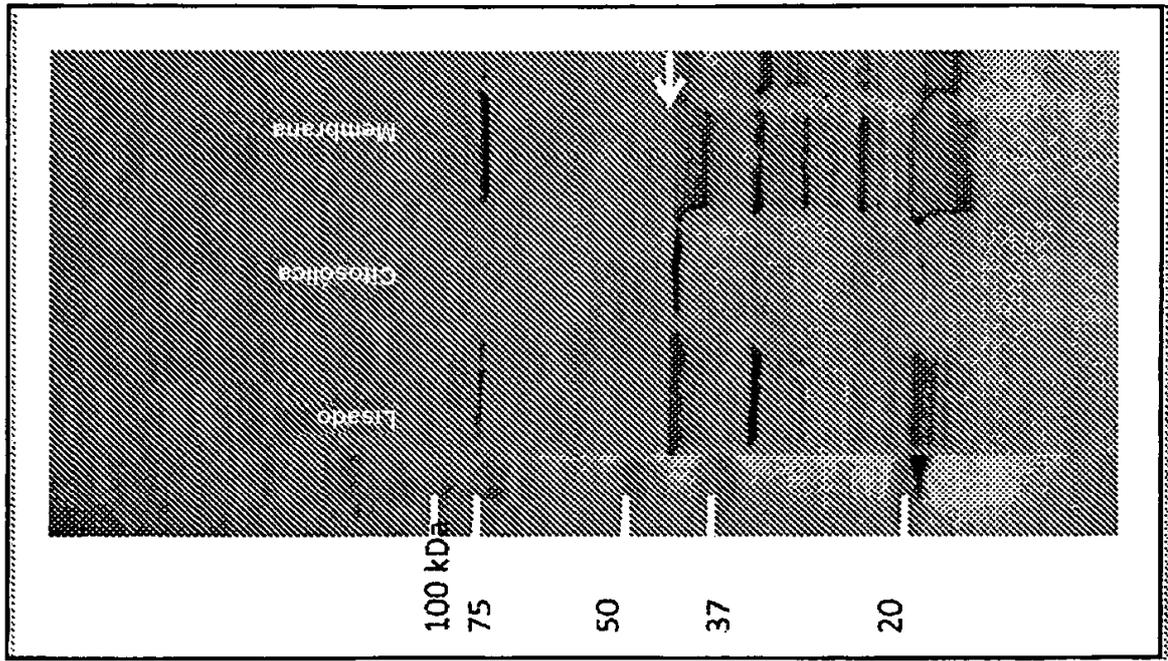


FIGURA 9

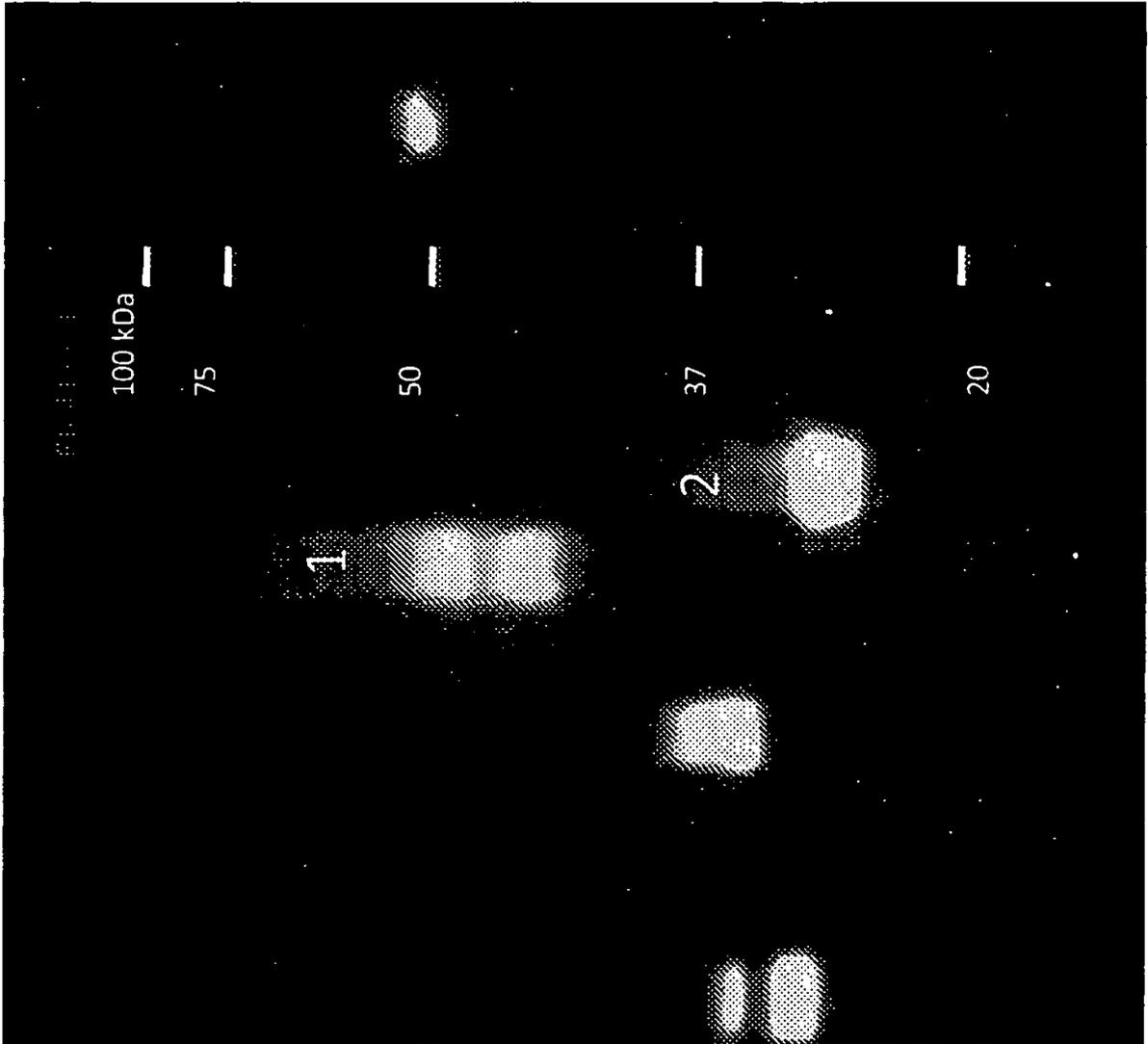


FIGURA 10

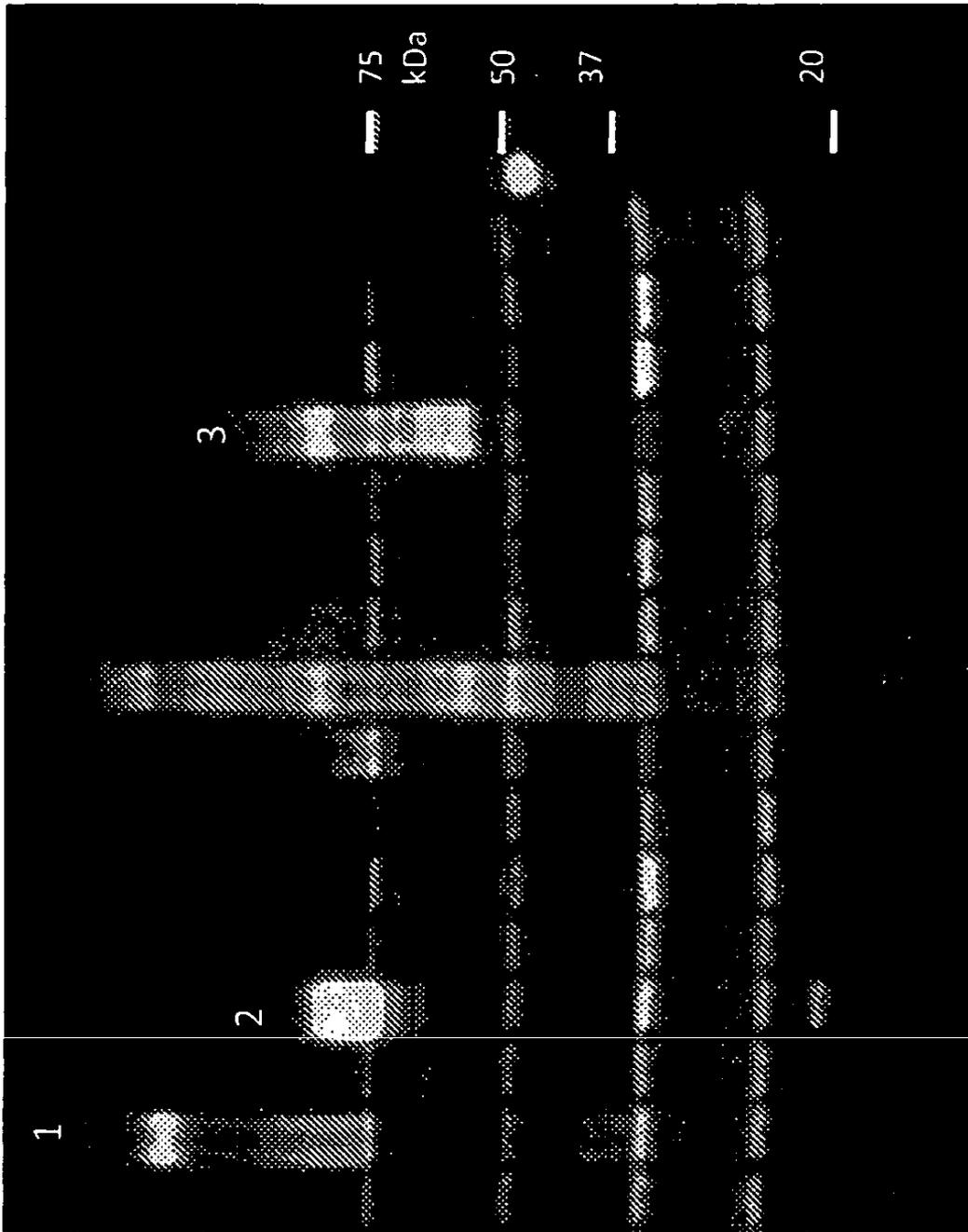


FIGURA 11

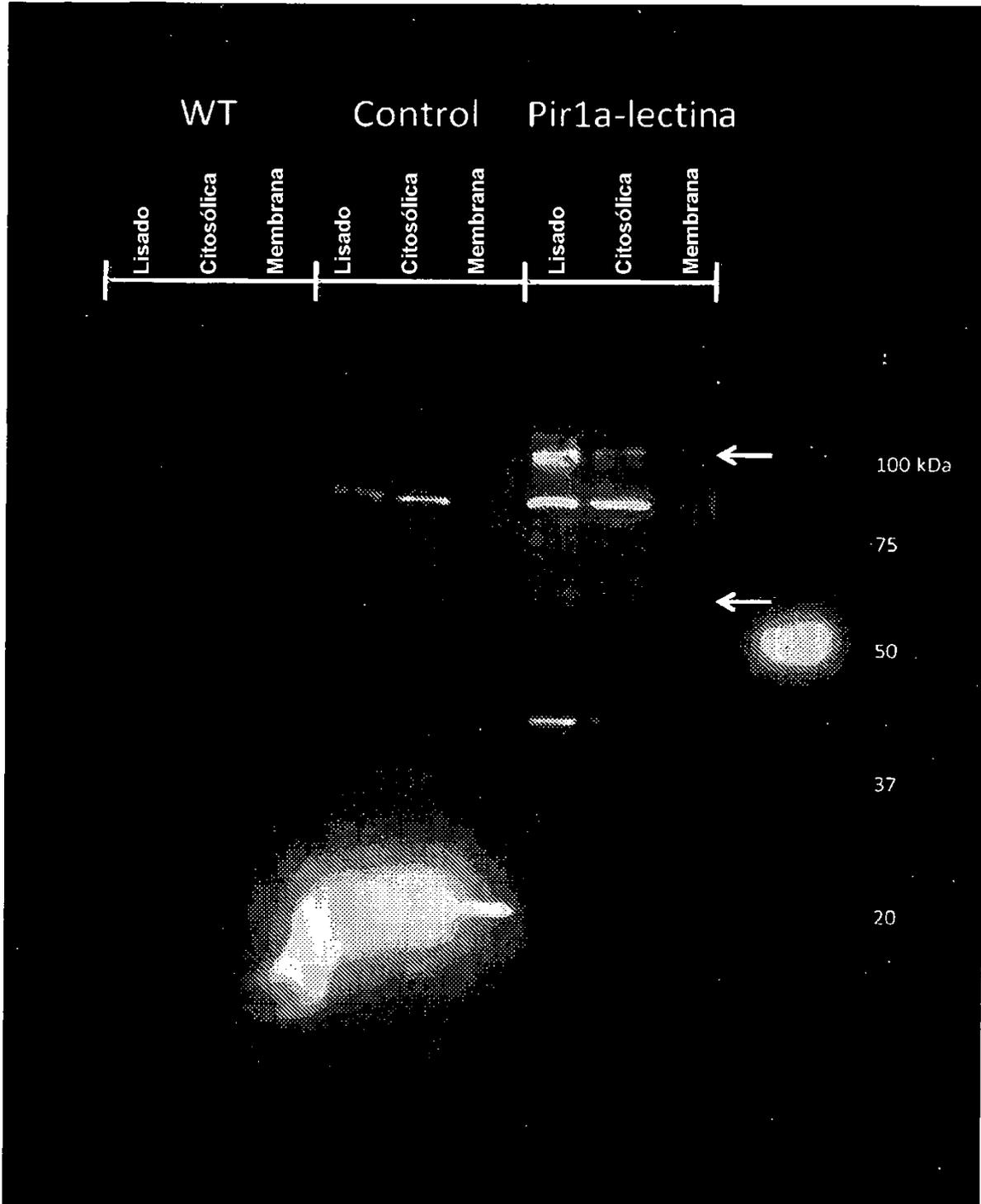


FIGURA 12

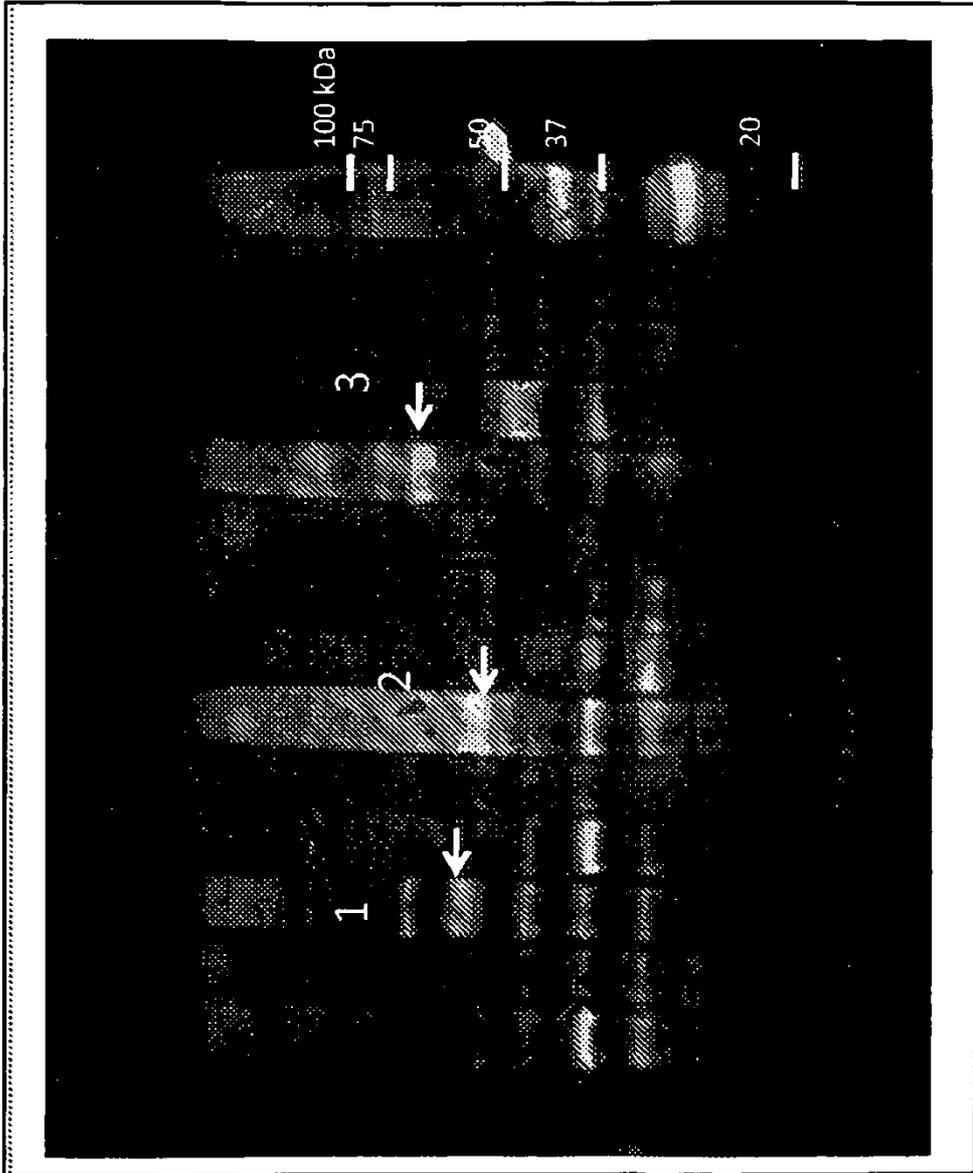


FIGURA 13

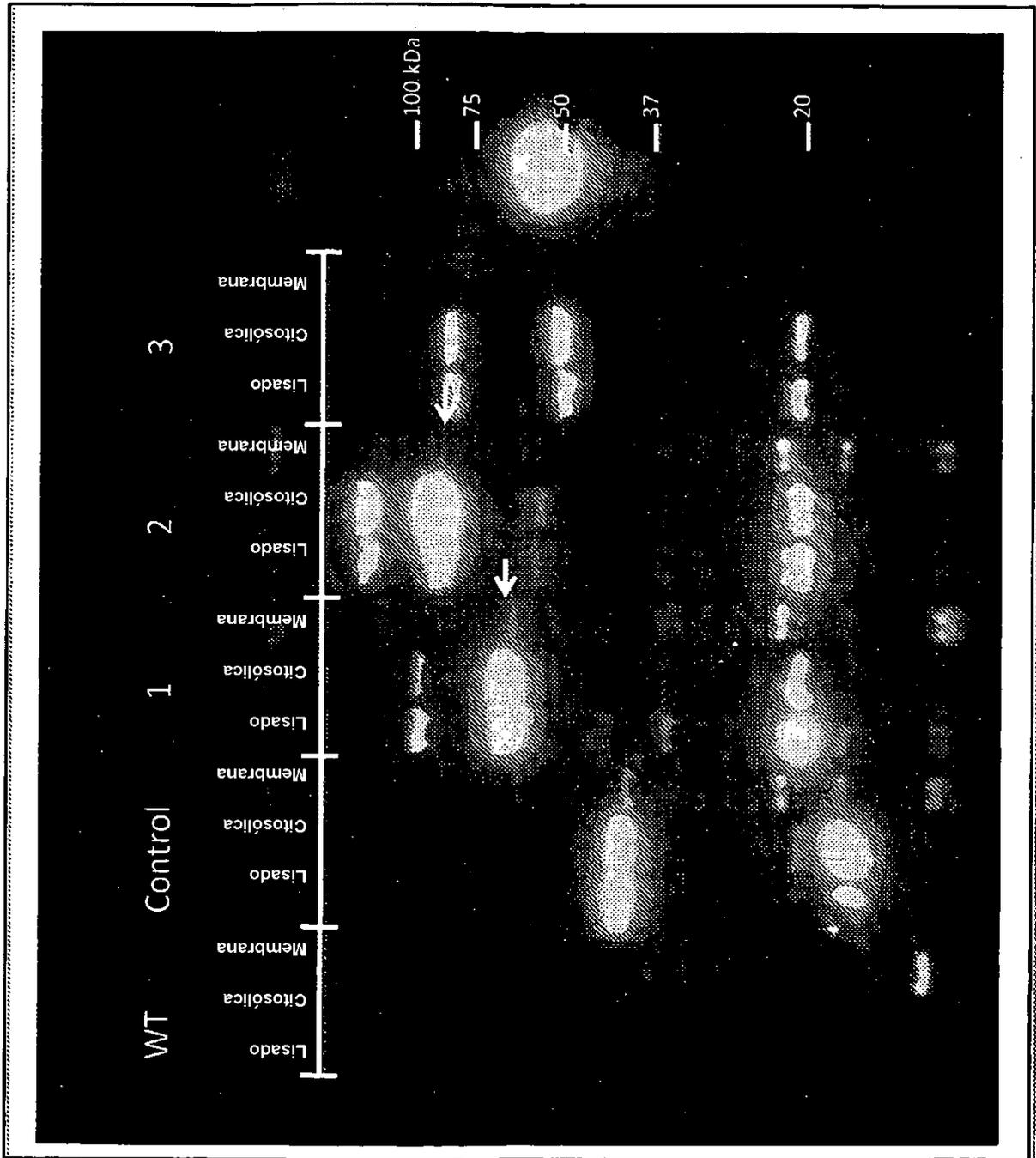
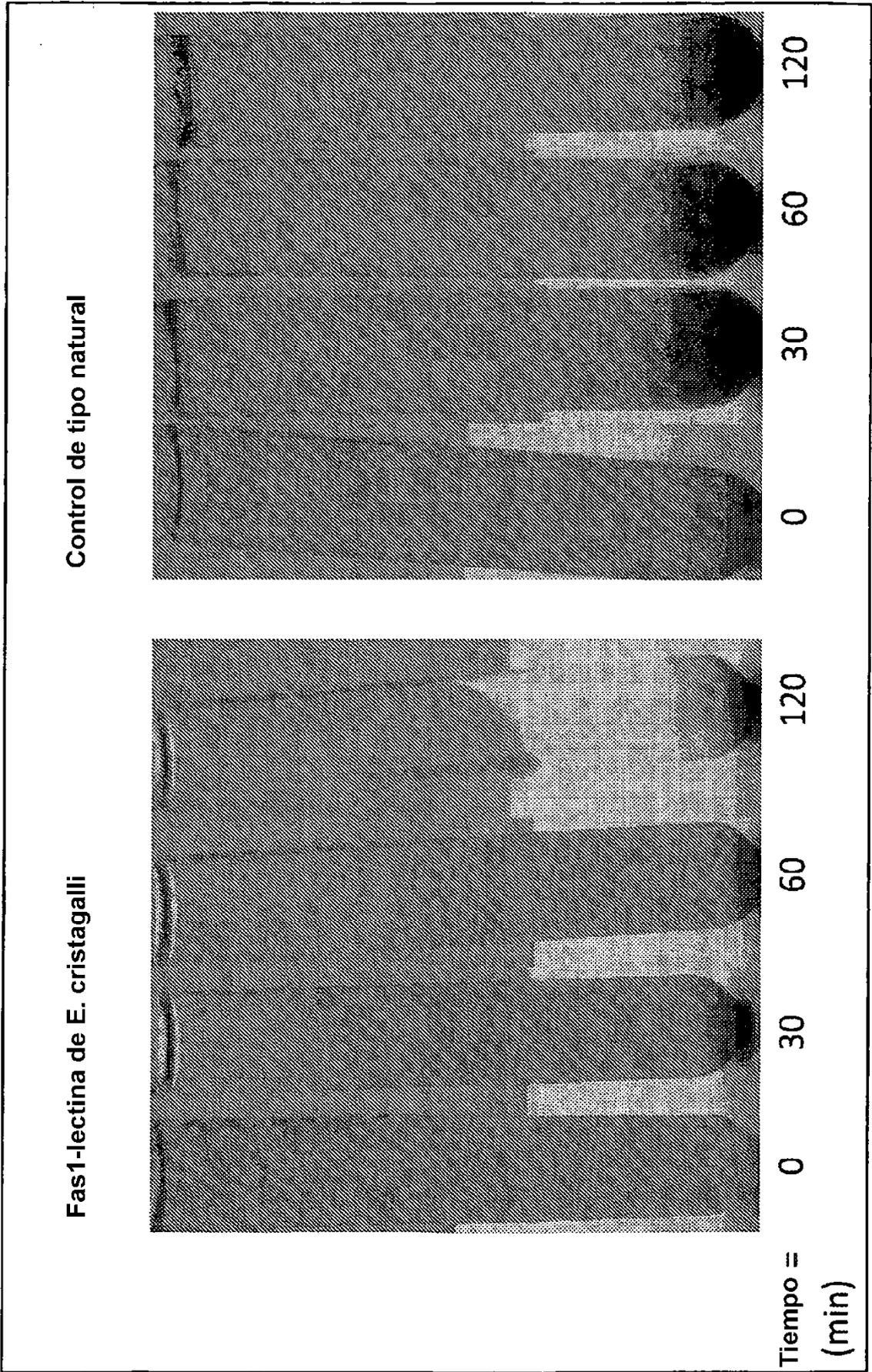


FIGURA 14

FIGURA 15



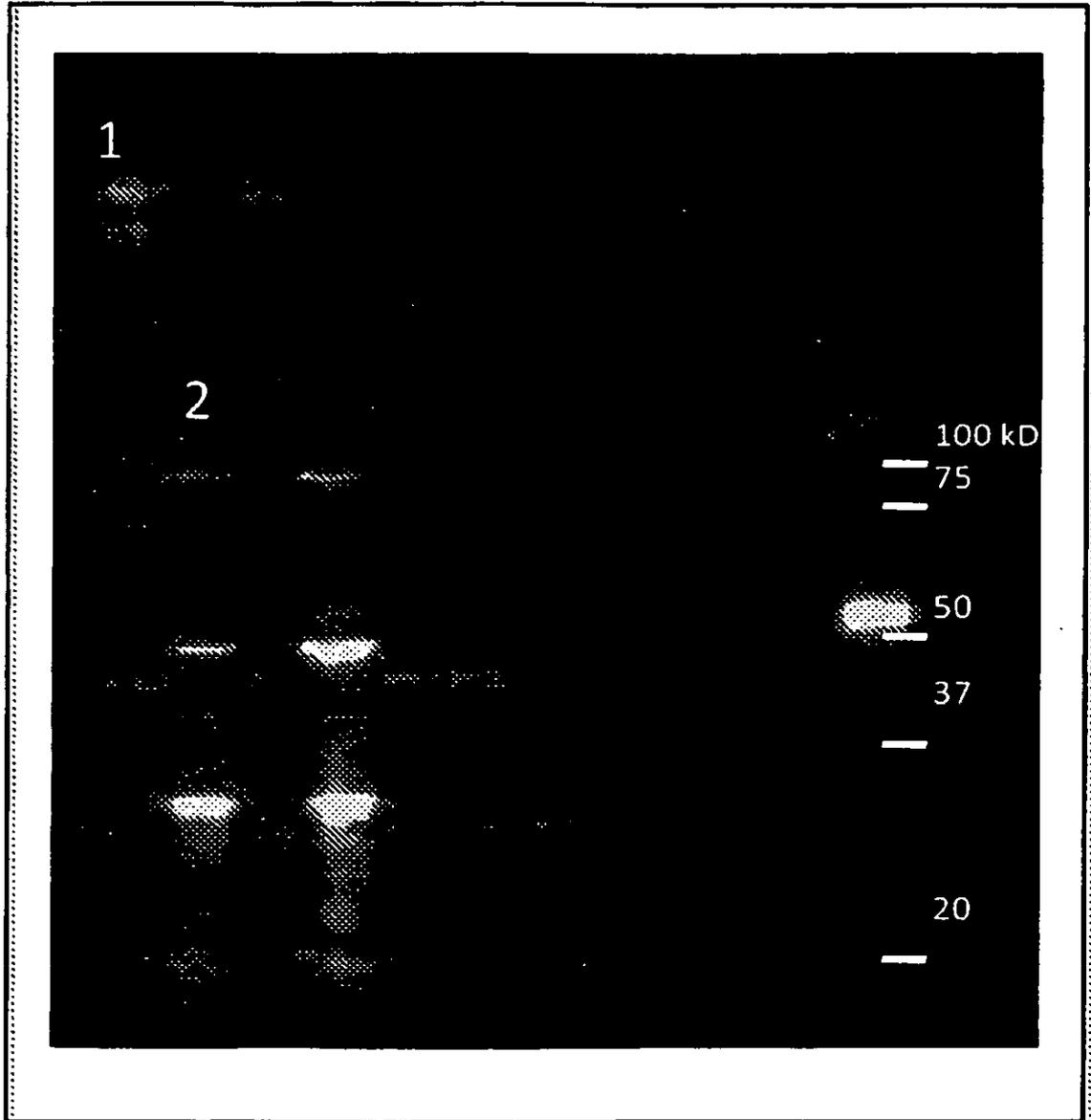


FIGURA 16

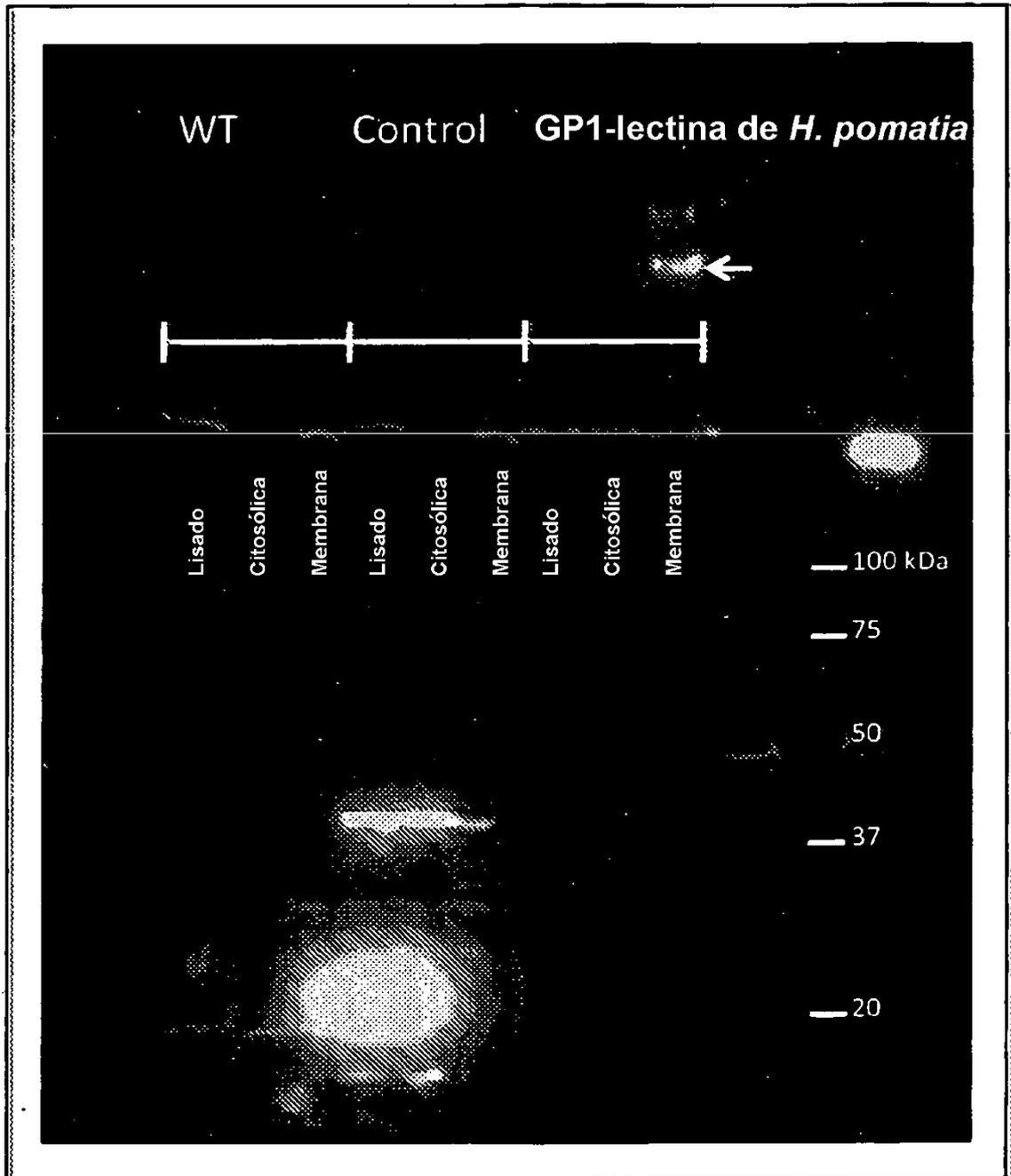
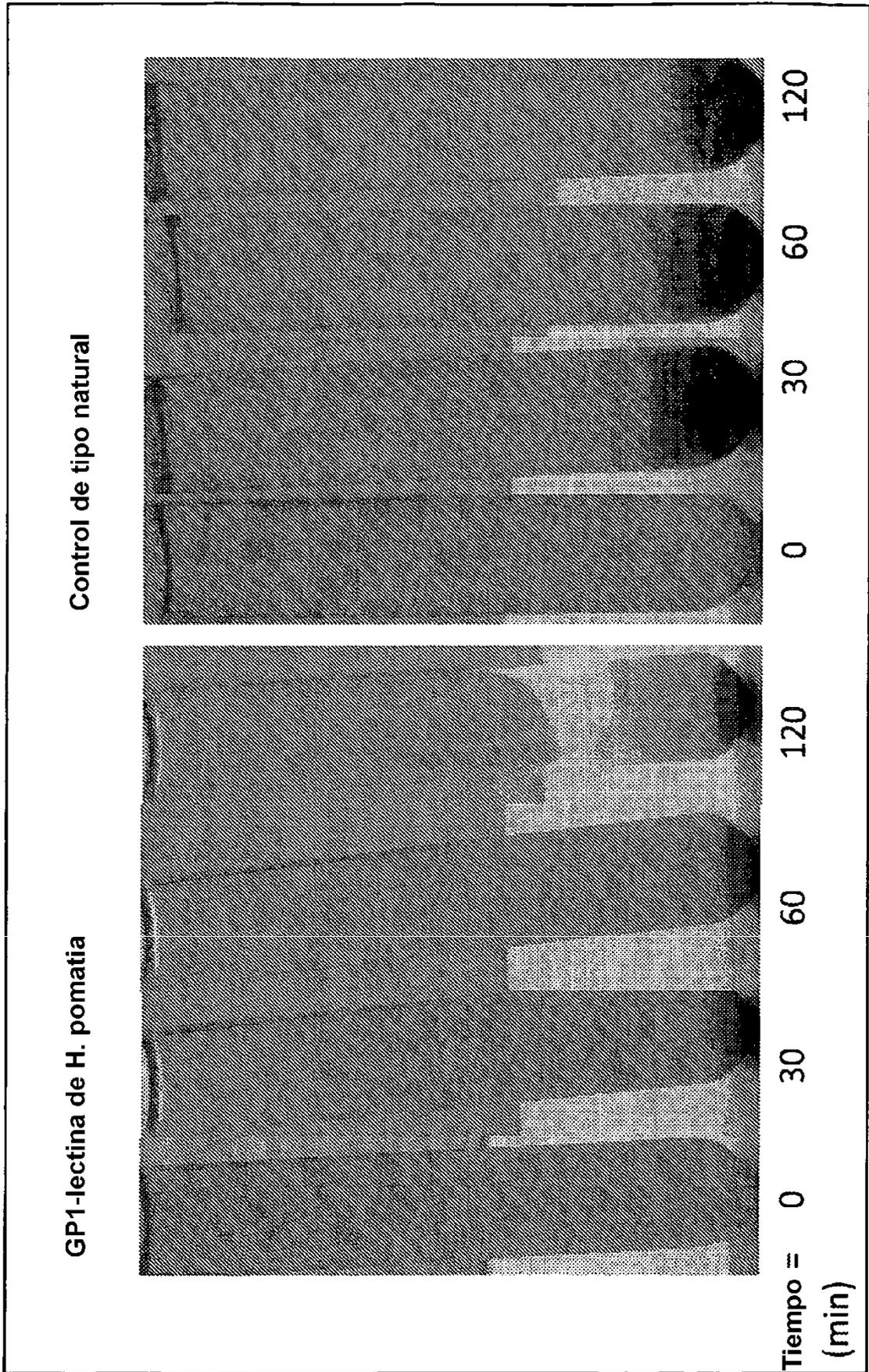


FIGURA 17

FIGURA 18



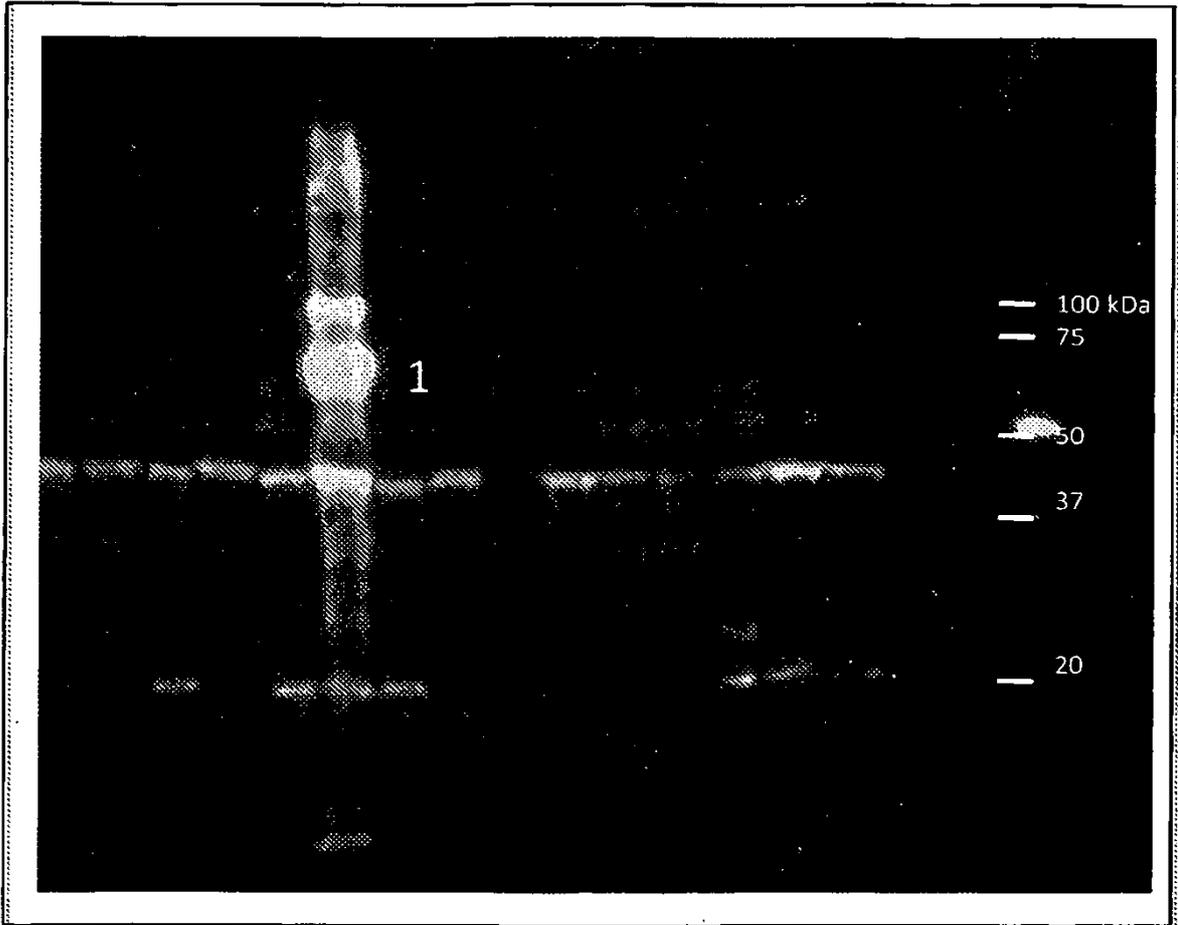


FIGURA 19

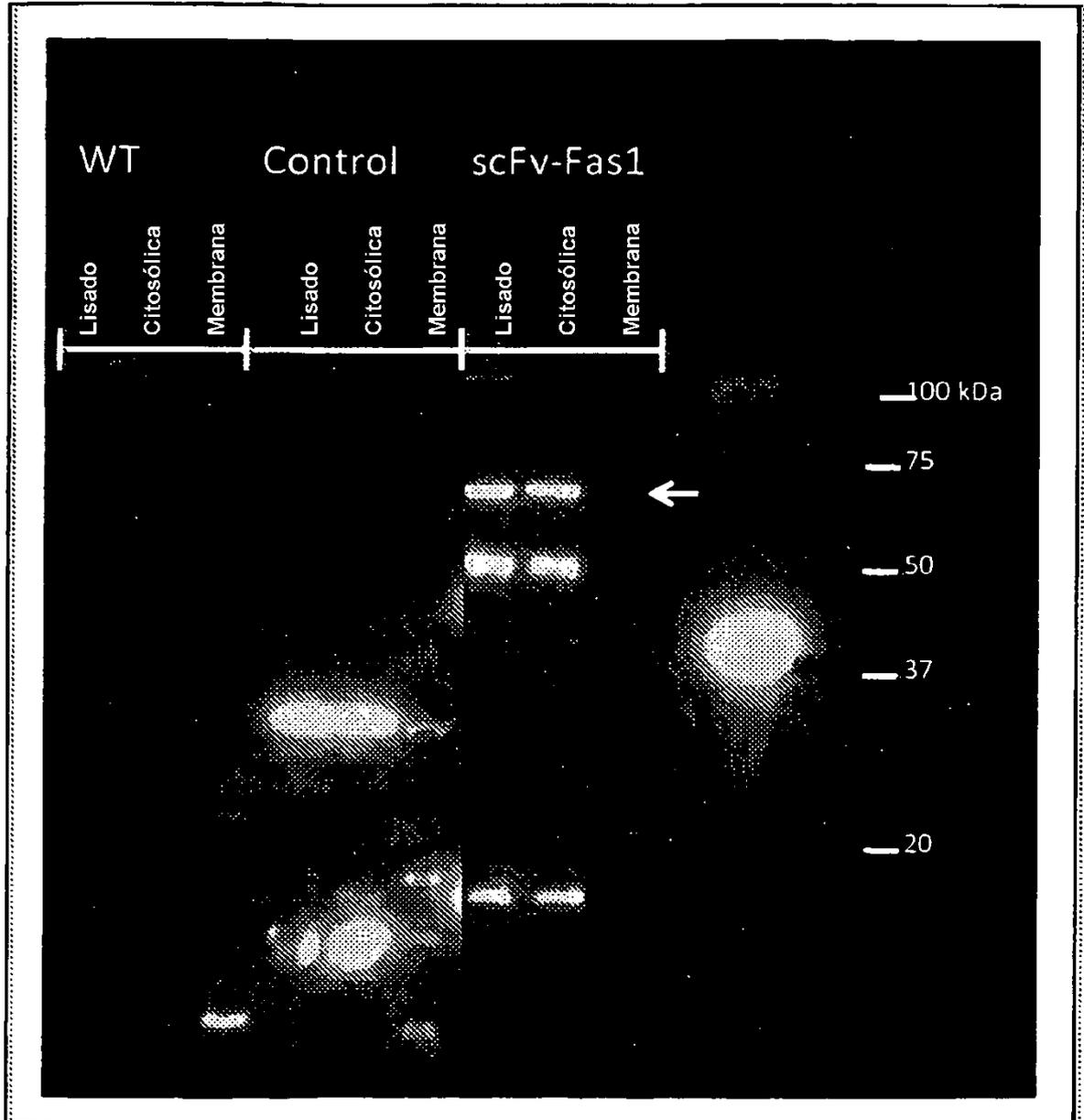


FIGURA 20

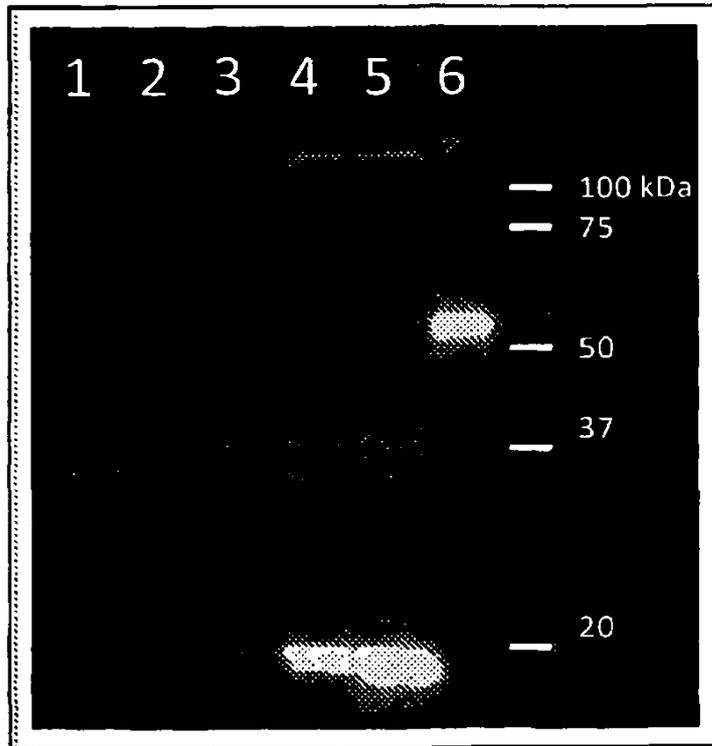


FIGURA 21

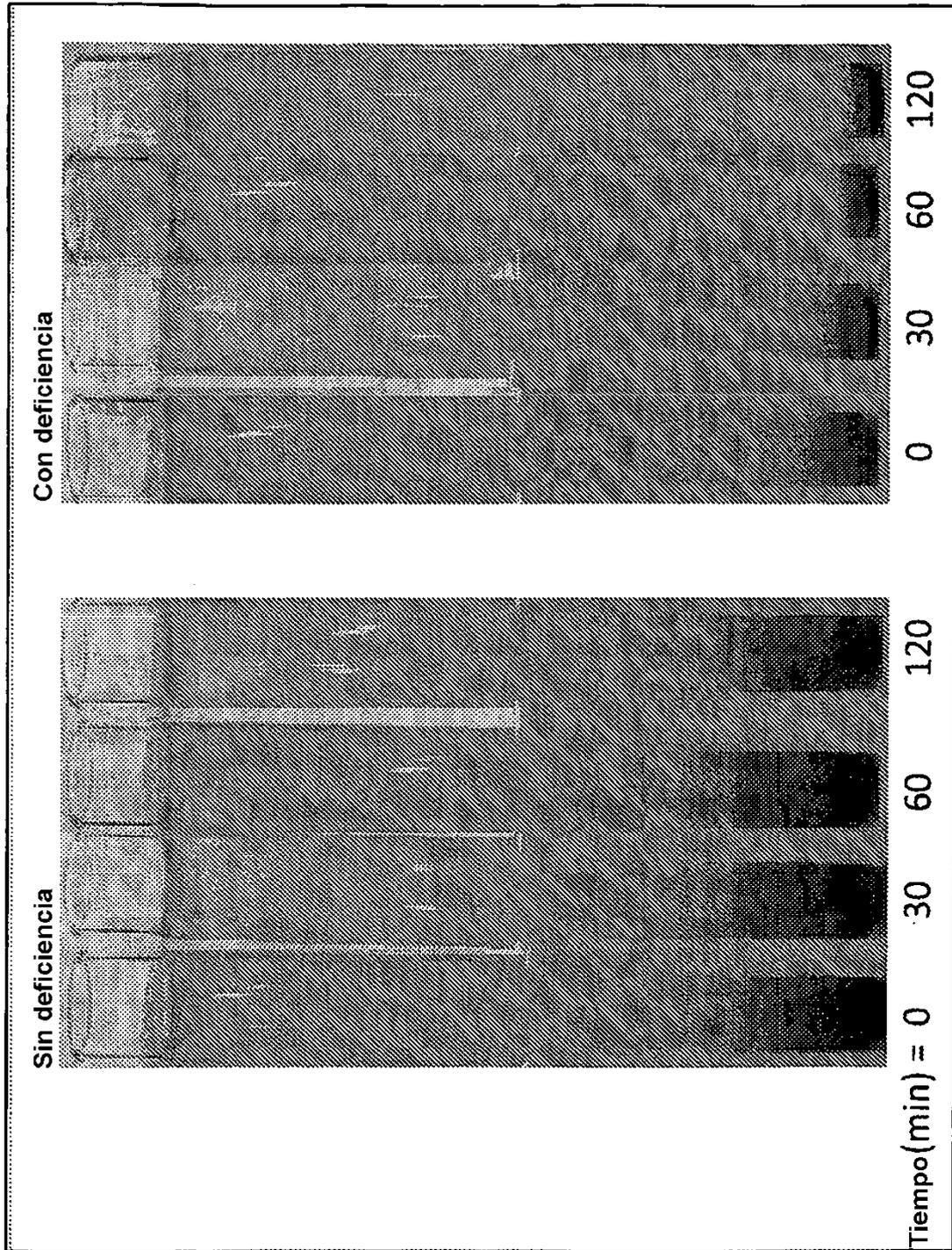


FIGURA 22

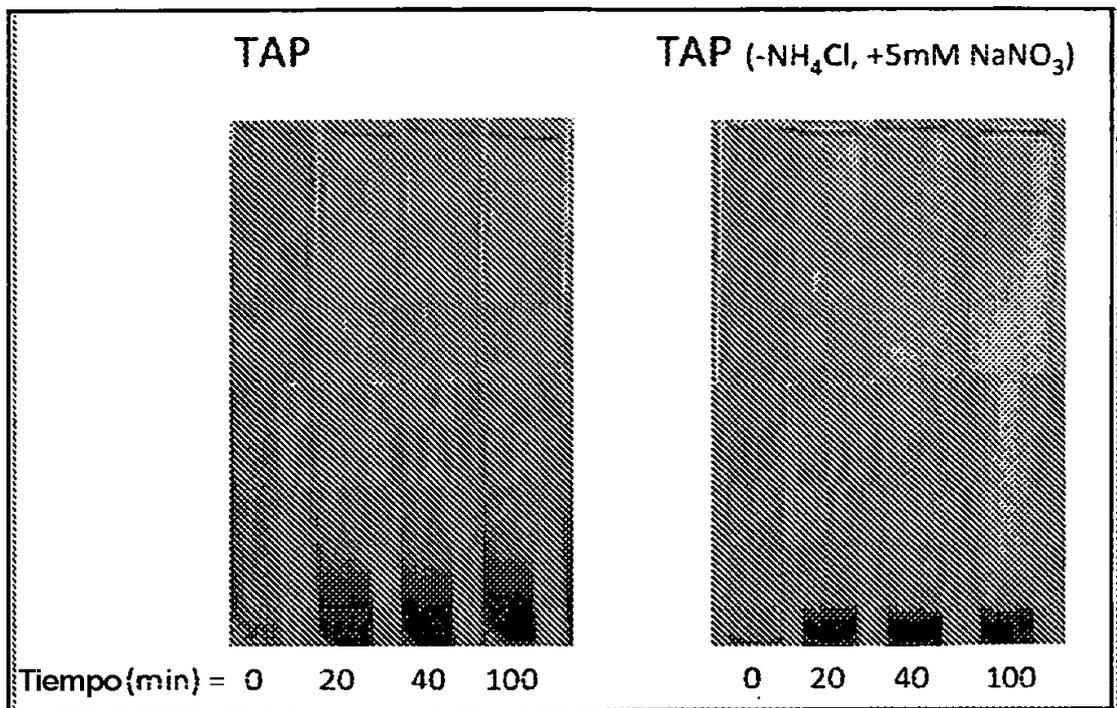


FIGURA 23