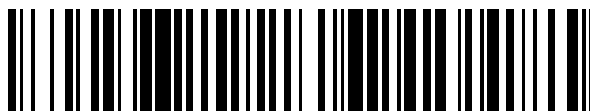


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 743**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013** **PCT/FR2013/051383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13186495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013** **E 13733399 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 2861743**

54 Título: **Método de producción de alérgenos recombinantes de alta calidad en una planta**

30 Prioridad:

13.06.2012 FR 1255510

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

19.02.2019

73 Titular/es:

ANGANY INC. (100.0%)
873, Rue St-Jean, Suite 200
Québec, QC G1R 1R2, CA

72 Inventor/es:

GOMORD, VÉRONIQUE;
FITCHETTE, ANNE CATHERINE y
FAYE, LOÏC

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 700 743 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de producción de alérgenos recombinantes de alta calidad en una planta

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método de producción de alérgenos recombinantes de alta calidad.

10 **Estado de la técnica**

La utilización de alérgenos recombinantes permite una mayor especificidad y una mejor eficacia de los ensayos de diagnóstico y del tratamiento de las alergias.

Numerosos alérgenos ya se han producido en forma recombinante. Se utilizan actualmente para el diagnóstico *in vitro* de alergias. Sin embargo, el sistema de expresión utilizado, generalmente *E. coli*, solo permite, a menudo, obtener copias muy aproximativas de alérgenos naturales, debido a la incapacidad de esta bacteria para realizar las modificaciones postraduccionales necesarias para un plegamiento correcto de las proteínas de eucariotas. Con frecuencia esto perjudica a la fiabilidad y a la sensibilidad de los ensayos diagnósticos realizados utilizando esas moléculas, porque determinados epítopos susceptibles de reaccionar con las inmunoglobulinas E (IgE) de los

También se han utilizado sistemas de expresión de eucariotas para la producción de alérgenos recombinantes. Los más habituales son las levaduras, y en este caso, la hiperglicosilación, específica de estos organismos, tampoco permite la producción de alérgenos recombinantes conformes a sus homólogos naturales.

Las plantas son los únicos hospedadores eucariotas que permiten la producción de alérgenos complejos en forma recombinante, debido a costes de producción y a una calidad compatible con su utilización para un tratamiento personalizado de las alergias, que integran los ensayos de diagnóstico y la terapia.

En cambio, los sistemas de expresión vegetales utilizados hasta ahora para la producción de alérgenos recombinantes recurren generalmente a la transgénesis vegetal con sus bien conocidas limitaciones principales, es decir:

- tiempos prolongados de transferencia del gen a la proteína; lo que significa un esfuerzo de desarrollo de varios años, y
- escasos rendimientos, del orden del 0,1 % al 1 % de las proteínas solubles, lo que significa el tratamiento de una gran biomasa de materia vegetal para una producción a gran escala.

Los recientes avances realizados gracias a la expresión transitoria han permitido superar estas limitaciones, por un lado reduciendo considerablemente los periodos de tiempo de transferencia del gen a la proteína, lo que permite un esfuerzo de desarrollo mucho más rápido, y por otro lado, aumentar los rendimientos de producción como mínimo a un factor de 10, lo que minimiza las inversiones de la extracción y purificación de la proteína de interés.

Hoy en día, en los vegetales, determinadas empresas, utilizan una técnica de expresión transitoria de este tipo a gran escala para la producción de vacunas, desarrollando actualmente inmensas unidades de producción en los Estados Unidos.

Por lo tanto, a pesar de estos esfuerzos, siempre existe una necesidad de disponer de un método de producción eficaz y reproducible de alérgenos recombinantes, que permita la obtención de alérgenos recombinantes que tengan una composición y una conformación similares a las de sus homólogos naturales. Asimismo, existe una necesidad de un método que tenga un buen rendimiento de producción.

Objeto de la invención

La presente invención permite obtener proteínas recombinantes complejas, en particular, alérgenos recombinantes complejos, que jamás se han obtenido anteriormente en forma recombinante. Estos alérgenos son además copias conformes a sus homólogos naturales.

La presente invención se refiere por tanto a un procedimiento de producción de una proteína recombinante en una planta de tabaco de la especie *Nicotiana benthamiana*, que comprende las siguientes etapas:

- a) el cultivo de plantas en aeroponía o en hidroponía, preferentemente sobre flotadores móviles, y con luz LED (del inglés, *Light Emitting Diode*, diodo emisor de luz),
- b) la agroinfiltración de las plantas obtenidas en la etapa a), al vacío, por agrobacterias que comprenden el vector de expresión pAG01 de secuencia SEQ ID NO 21, comprendiendo dicho vector un fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante, y después
- c) volver a cultivar las plantas después de la etapa b), en las mismas condiciones que las de la etapa a), y después

d) la extracción y la purificación de la proteína recombinante a partir de las partes aéreas de las plantas producidas en la etapa c).

La presente solicitud también describe una proteína recombinante que es posible obtener mediante el procedimiento según la invención.

La planta utilizable en el procedimiento descrito en el presente documento, es particularmente una planta de tabaco seleccionada entre *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*, o incluso cualquier otra planta utilizable para la expresión transitoria, como una planta de lechuga (género *Lactuca*) o una planta de espinaca (*Spinacia oleracea*). Entre las lechugas, pueden citarse las variedades de lechuga *Appia*, *Grosse Blonde Paresseuse*, *Lollo Rossa*, *Merveille* de cuatro estaciones, hoja de roble o *Red sails*. La planta también puede ser del género *Arabidopsis*, o uno de sus mutantes, en particular mutantes de glucosilación de *Arabidopsis*; finalmente, pueden utilizarse plantas de tabaco de tabaco genosuprimidas (en particular mutantes de glucosilación). La planta utilizada según la invención es *N. benthamiana*.

La proteína recombinante producida mediante el procedimiento según la invención, es un alérgeno recombinante, preferentemente un alérgeno recombinante de acárido.

Por "alérgeno" se entiende cualquier proteína o cualquier péptido capaz de provocar una reacción alérgica en un sujeto, previamente sensibilizado, cuando se pone en contacto, lo más a menudo por contacto con la piel, por inhalación o ingestión. Un alérgeno se denomina "principal" cuando un alérgeno purificado desencadena una alergia en el 50 % o más de los pacientes sometidos a pruebas, y que presenta IgE específicas, con pruebas cutáneas inmediatamente positivas, a una concentración muy débil, teniendo al menos el 70 % de los sujetos la enfermedad alérgica en relación con este alérgeno.

Por "proteína", se entiende una secuencia que comprende al menos 50 aminoácidos.

Por "péptido", se entiende una secuencia que comprende entre 1 y 49 aminoácidos, preferentemente entre 2 y 40 aminoácidos.

Preferentemente, la proteína recombinante producida por el procedimiento según la invención, es un alérgeno, un fragmento de alérgeno o una proteína de fusión que comprende un alérgeno o un fragmento de alérgeno

Preferentemente, la proteína recombinante se selecciona de entre los alérgenos responsables de alergias respiratorias procedentes de ácaros domésticos, tales como *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* o *Euroglyphus manei*, los alérgenos de ácaros de almacenamiento tal como *Blomia tropicalis*, los alérgenos de ácaros de tipo *Acarus siro* (anteriormente denominado *Tyroglyphus farinae*), los alérgenos de cucarachas, los alérgenos de pólenes de árboles o de gramíneas, los alérgenos de animales (gato, perro, caballo), los alérgenos de hongos, los alérgenos responsables de alergias de contacto como los del látex de *Hevea* (árboles del género *Hevea*) o incluso los alérgenos responsables de alergias alimentarias (leche, huevo, pescado, frutas).

Entre los alérgenos de *Dermatophagoides farinae*, se pueden citar Der f 10, Der f 11, Der f 13, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18, Der f 2, Der f 2.0101, Der f 2.0102, Der f 2.0103, Der f 2.0104, Der f 2.0105, Der f 2.0106, Der f 2.0107, Der f 2.0108, Der f 2.0109, Der f 2.0110, Der f 2.0111, Der f 2.0112, Der f 2.0113, Der f 2.0114, Der f 2.0115, Der f 2.0116, Der f 2.0117, Der f 20, Der f 3, Der f 4, Der f 5, Der f 6, Der f 7, Der f 8, Der f 9 y Der f HSP70.

Entre los alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, se pueden citar Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 2, Der p 2.0101, Der p 2.0102, Der p 2.0103, Der p 2.0104, Der p 2.0105, Der p 2.0106, Der p 2.0107, Der p 2.0108, Der p 2.0109, Der p 2.0110, Der p 2.0111, Der p 2.0112, Der p 2.0113, Der p 20, Der p 21, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9.

Entre los alérgenos de *Blomia tropicalis*, se pueden citar Blo t 1, Blo t 5 (que presenta una homología de secuencia de 40 % con Der p 5), Blo t 9, Blo t 10, Blo t 12 o Blo t 21.

Todos estos alérgenos son muy conocidos, y su secuencia puede encontrarse principalmente en bases de datos tales como Allergome (allergome.org), o simplemente en UniProt.

El procedimiento de producción de alérgenos recombinantes por expresión transitoria según la invención, en *N. benthamiana*, es muy eficaz, reproducible, y presenta un buen rendimiento.

El procedimiento de producción de proteínas recombinantes según la invención comprende una primera etapa de cultivo de la planta (etapa a), en aeroponía o en hidroponía, preferentemente en cultivo sobre flotadores móviles libres, y con luz LED, para producir una proteína recombinante.

La aeroponía corresponde al cultivo de la planta sobre un soporte, generalmente de plástico, asociado a vaporizaciones permanentes de soluciones nutritivas a base de sales minerales.

La hidroponía corresponde al cultivo de la planta sin suelo, cultivándose dicha planta sobre un sustrato neutro e inerte, tal como arena, bolitas de arcilla, placas de poliestireno o lana de roca. El sustrato está regularmente irrigado por una

corriente de solución que lleva sales minerales y nutrientes esenciales a la planta. En el procedimiento utilizado según la invención, las plantas de tabaco, principalmente *N. benthamiana*, se cultivan preferentemente en hidroponia sobre flotadores libres, por ejemplo, en una placa de poliestireno perforada. Estos flotadores se disponen en cubas que contienen un medio de cultivo aéreo permanente gracias a difusores de aire. Esta técnica permite una estandarización de las condiciones de producción de las proteínas recombinantes, junto con la ausencia total de riesgo de contaminación de los medios de agroinfiltración durante la etapa b), por impurezas o residuos procedentes de los sustratos contenidos en las macetas (en el caso de cultivos clásicos). Además, como se muestra en los ejemplos, la utilización de este sistema de cultivo permite obtener rendimientos muy superiores.

Finalmente, durante la mejora, la manipulación para la agroinfiltración o la recogida de lotes de plantas establecidas sobre una placa de poliestireno, es evidentemente más fácil que la de las plantas cultivadas en maceta y sustrato.

El procedimiento de producción de proteínas recombinantes según la invención comprende, después de la etapa a), una etapa b) de agroinfiltración de la planta, particularmente de la planta de tabaco, al vacío, por agrobacterias que comprenden el vector de expresión pAG01 de secuencias SEQ ID NO : 21, comprendido dicho vector un fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante.

Particularmente, después de cinco semanas de cultivo, preferentemente en hidroponia sobre flotadores móviles libres, la agroinfiltración de las plantas de tabaco se realiza al vacío, por agrobacterias que comprenden un fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante.

Esta etapa b) de agroinfiltración, puede realizarse mediante cualquier medio que permita hacer el vacío. Preferentemente, el procedimiento utilizado según la invención, se realiza al vacío por efecto Venturi.

El fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante, utilizado en la etapa a) e introducido en las agrobacterias, puede prepararse por clonación. Este fragmento de ADN puede comprender la secuencia que codifica la proteína recombinante, por ejemplo, un alérgeno heterólogo, estando dicha secuencia fusionada a una secuencia que codifica un péptido que facilita su purificación, como por ejemplo una secuencia de "etiqueta de histidina" o una secuencia que codifica un péptido o un polipéptido de direccionamiento intracelular. Dicho péptido o polipéptido de direccionamiento intracelular puede seleccionarse particularmente entre los péptidos cuyas secuencias se presentan en la tabla 1, es decir, entre los péptidos de SEQ ID NO :1 a 20. Después, el fragmento de ADN se integra en el vector de expresión pAG01 desarrollado en el ámbito de la invención (figura 1 y secuencia SEQ ID NO : 21), seguidamente, las agrobacterias se transforman utilizando este vector de expresión. La presente solicitud también describe un vector de expresión que comprende la secuencia SEQ ID NO :21 y un inserto, particularmente localizado entre los bordes derecho e izquierdo del ADN de transferencia (ADNT) (esto se ilustra en la figura 1, en la que el borde izquierdo es "LB, Left Border" y el borde derecho es "RB, Right Border"), comprendiendo dicho inserto al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido seleccionado entre SEQ ID NO :1 a 20, estando dicha secuencia de ácido nucleico directamente fusionada a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés. Este vector corresponde al vector pAG01 que comprende un inserto, comprendiendo dicho inserto una secuencia de ácido nucleico de péptido (seleccionada entre SEQ ID NO:1 a 20) directamente fusionada a la secuencia de ácido nucleico del alérgeno de interés. Preferentemente, la proteína de interés es un alérgeno, tal y como se describe anteriormente en el presente documento.

La agroinfiltración de partes aéreas de las plantas, principalmente plantas de tabaco, principalmente plantas de *N. benthamiana*, se realiza al vacío. Preferentemente, se utiliza una campana hermética, que posee un sistema de vacío por efecto Venturi. Típicamente, la campana contiene el cultivo de agrobacterias y después del cambio de las placas flotantes sobre las cuales se cultivan las plantas en hidroponia, estas últimas se sumergen, boca abajo, en la suspensión bacteriana. Este procedimiento se ilustra en la figura 2 y permite infiltrar simultáneamente todas las plantas cultivadas sobre una misma placa flotante.

Según un primer modelo de realización, la agroinfiltración se realiza mediante una etapa de poner al vacío las plantas durante 2 minutos.

Preferentemente, según un segundo modelo de realización, la agroinfiltración se realiza en tres etapas (proceso secuencial):

- 1) poner al vacío, preferentemente a -0,8 bar durante 2 minutos,
- 2) quitar el vacío, y regresar a la presión atmosférica preferentemente durante 30 segundos, y después,
- 3) poner al vacío, preferentemente a -0,8 bar durante 2 minutos, y después regresar a la presión atmosférica.

Esta técnica de agroinfiltración es rápida (duración total inferior a 5 minutos), eficaz y fácil de automatizar.

Entre las agrobacterias utilizables según la invención, se pueden citar preferentemente, las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 o C58.

Preferentemente, para la infiltración, las agrobacterias se utilizan a una concentración definida por una DO600

comprendida entre 0,7 y 1,0, en una solución que comprende 10 mM de Mes (ácido 2-morfolino etanosulfónico), que eventualmente puede sustituirse por MOPS (ácido 3-(N-morfolino propanosulfónico), 10 mM de MgCl₂ y 100 µM de acetosiringona.

- 5 Al final de la etapa b) de agroinfiltración, el procedimiento comprende una etapa c) de volver a poner en cultivo las plantas, en las mismas condiciones que las de la etapa a).

Normalmente, el drenaje de las plantas se realiza poniendo las plantas boca abajo durante 15 minutos, y después se vuelven a poner en cultivo en las condiciones descritas en la etapa a), garantizando idealmente una vaporización frecuente de estas últimas durante las 6 primeras horas de cultivo que siguen a la agroinfiltración. De manera alternativa, las plantas se vuelven a poner directamente en cultivo en las condiciones descritas para la etapa a).

Finalmente, el procedimiento según la invención comprende una etapa d) de extracción y de purificación de la proteína recombinante producida después de la agroinfiltración en la etapa c).

15 La recogida de la biomasa vegetal se efectúa de 4 a 5 días después de la puesta en cultivo de las plantas que sigue a la agroinfiltración. Después de la trituración y la extracción de las proteínas a partir de partes aéreas de las plantas, la proteína recombinante se purifica. En esta etapa pueden realizarse técnicas extracción y de purificación conocidas en la materia. Preferentemente, si la proteína recombinante comprende una secuencia de "etiqueta de histidina", esta se purifica por cromatografía en columna de níquel inmovilizado (IMAC, del inglés *Immobilized Metal Affinity Chromatography*, cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados), seguido de una etapa de tamizado molecular. Después, la secuencia de etiqueta utilizada para la purificación puede escindirse del producto final.

Descripción de las figuras

25 La invención va a ilustrarse ahora utilizando los siguientes ejemplos no limitativos.

Las leyendas de las figuras son las siguientes:

30 Tabla 1 (Figura 8): Secuencias de Reozyme™ utilizadas para la expresión dirigida de alérgenos recombinantes y compartimento subcelular de almacenamiento de alérgenos cuando se producen en fusión con péptidos de direccionamiento. ER: retículo endoplasmático; AG: Aparato de Golgi.

Figura 1: El ADN-T del vector pAG01 está constituido por dos secuencias de borde (RB y LB) de ADN-T de agrobacterias, y tres casetes de expresión que permiten la expresión del inhibidor de silenciamiento (casete 1), de una proteína recombinante preferentemente un alérgeno (casete 2) y de una enzima que confiere una resistencia a un antibiótico de selección o de una enzima de maduración de proteínas (casete 3).

Figura 2: La plataforma desarrollada según la invención asocia etapas y herramientas originales que permiten la producción en masa y a bajo coste de alérgenos recombinantes de una muy alta calidad inigualable. La adaptabilidad y la rapidez de producción, dado que bastan de 4 a 5 días para transferir el gen a la proteína, son también características de esta plataforma de producción.

Figura 3: Producción de alérgenos complejos principales del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*: Der p 4 (carril 1); Der p 7 (carril 2); Der p 21 (carril 4); Der p 5 (carril 6) et Der p 2 (carril 7); de uno de los alérgenos principales del látex: Hev b 13 (carril 3) y un alérgeno de hongo: CP120 (carril 5).

Figura 4: Ilustración esquemática de casetes de expresión utilizados (panel A). En el panel B, los análisis por transferencia Western ilustran las diferencias de calidad del alérgeno Der p 2 producido en fusión con diferentes señales de Reozyme™. El alérgeno se produce en forma heterogénea y presenta una masa molecular no conforme cuando se utilizan las señales R1, R2 y R3 de Reozyme™. En cambio, cuando se utiliza la señal R4, el alérgeno recombinante es homogéneo y presenta una masa molecular idéntica a la del alérgeno natural.

Figura 5: El panel A presenta el análisis por SDS-PAGE de proteínas totales extraídas de cada planta. El análisis de estos extractos por transferencia Western (paneles B y C) ilustran los rendimientos de producción para una misma proteína de interés, cuando las plantas se cultivan en condiciones estándar (cultivo en maceta + luz por lámpara incandescente) (carriles 1-6, correspondiendo los diferentes carriles a diferentes sucesos de transformación) o bien se cultivan en aeroponía + luz LED (carriles 7-9). Panel B: revelado cromogénico; panel C: revelado por quimioluminiscencia.

Figura 6: Comparación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*): 1) cuando la agroinfiltración se efectúa según el protocolo descrito en la invención (panel B), o 2) cuando la infiltración se efectúa según un método de infiltración clásico (panel A).

Figura 7: Análisis por SDS-PAGE y transferencia Western de etapas de purificación del alérgeno Der p 4. Carril 1: Extracto proteico total.

Carril 2: Der p 4 purificado sobre la columna de níquel inmovilizado (IMAC) y eluido en presencia de imidazol 50 mM
 Carril 3: Der p 4 purificado por tamizado molecular después de la etapa IMAC.

Carril 4: Der p 4 purificado y por tanto la etiqueta se ha escindido *in vitro*.

Panel superior: Análisis de Der p 4 por SDS-PAGE seguido de tinción de proteínas con azul de Coomassie en el gel.

- 5 Panel inferior: Análisis de Der p 4 por SDS-PAGE seguido de transferencia western e inmunodetección sobre el molde con un suero inmunoespecífico de etiqueta de purificación.

Descripción detallada de la invención

10 Ejemplo 1: Producción estandarizada de antígenos complejos

Para validar el procedimiento descrito en el presente documento, los ADNc que codifican alérgenos complejos de ácaros, de árboles o de hongos, se clonaron en el vector pAG01. A continuación, estos vectores se introdujeron en las agrobacterias (cepa LBA4404) a fin de efectuar la expresión transitoria en *N. benthamiana*.

- 15 Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron según el procedimiento descrito a continuación: las semillas se sembraron en tierra y se cultivaron durante al menos 45 días en este sustrato. Preferentemente, las plántulas obtenidas de estas semillas se desarrollaron durante 15 días en este sustrato (y con luz LED), antes de transferirse en cubetas para el cultivo hidropónico sobre flotadores libres. Después, las plantas se cultivaron durante 25 días en esas condiciones en presencia de nutrientes y oligoelementos y con luz LED. En una alternativa a este protocolo, la utilización de semillas recubiertas permite la siembra directa de plantas de *N. benthamiana* sobre las placas flotantes. En estas condiciones, la germinación y el cultivo de las plantas se producen en condiciones de hidroponía.

- 25 Después de 40 días de cultivo, las plantas mantenidas sobre los flotadores, se transfirieron a una campana hermética para su transfección. Para introducir las agrobacterias portadoras del vector binario, la parte aérea de las plantas se sumergió (el flotador se volteó) en la solución de agrobacterias, cuya concentración correspondía a una DO 600: 0,7. La transfección se realizó al vacío en la campana hermética por efecto Venturi según el siguiente protocolo: 2 minutos al vacío (-0,8 bar), regreso a la normalidad, después de nuevo 2 minutos al vacío (-0,8 bar). A continuación, los flotadores se colocaron sobre soportes (con las plantas boca abajo) durante 10 a 15 minutos, para drenar las plantas.
 30 Después, las plantas, siempre mantenidas en las placas flotantes sobre las que se han cultivado, se reemplazaron en las cubetas de cultivo durante 4 días, idealmente garantizando una vaporización frecuente de estas últimas durante las 6 primeras horas de cultivo que siguen a la agroinfiltración.

- 35 Al final de estos 4 días, se recogieron las partes aéreas de las plantas que expresaban los diferentes alérgenos. Las proteínas se extrajeron en un tampón desnaturalizante y después se analizaron en SDS-PAGE y/o por transferencia Western utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo FLAG.

La figura 3 ilustra los resultados obtenidos. El método según la invención permite la producción de alérgenos complejos principales.

40

Ejemplo 2: el procedimiento según la invención permite controlar la calidad de los alérgenos

Para controlar la maduración y la homogeneidad de los alérgenos recombinantes, diferentes señales (R1, R2, R3 y R4) se fusionaron al alérgeno de interés, y después la proteína de fusión se clonó en el vector pAG01. A continuación, estos vectores se introdujeron en las agrobacterias (cepa LBA4404), con el fin de efectuar la expresión transitoria en *N. benthamiana*.

- 45

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron según el procedimiento descrito anteriormente: las semillas se sembraron en tierra y las plántulas obtenidas de esta semillas se desarrollaron durante 15 días en este sustrato (luz LED) antes de transferirse a los flotadores libres. Las plantas se cultivaron después durante 25 días en hidroponía sobre flotadores libres.

- 50

Después de 40 días de cultivo en estas condiciones, las plantas mantenidas en las placas flotantes de cultivo se transfirieron a una campana hermética para su transfección. Para introducir las agrobacterias portadoras del vector binario, la parte aérea de las plantas se sumergió (el flotador se volteó) en la solución de agrobacterias. La transfección se realizó al vacío en campana hermética por efecto Venturi según el siguiente protocolo: 2 minutos al vacío a (-0,8 bar), regreso a la normalidad, y después de nuevo 2 minutos al vacío (-0,8 bar). A continuación, los flotadores se colocaron sobre soportes (con las plantas boca abajo) durante 10 a 15 minutos para drenar las plantas. Después, las plantas, siempre mantenidas en los flotadores, se reemplazaron en las cubetas de cultivo durante 4 días.

- 55

Al final de estos 4 días, se recogieron las plantas que expresaban los diferentes alérgenos. Las proteínas se extrajeron triturando las partes aéreas en un tampón desnaturalizante y después se analizaron en SDS-PAGE y/o por transferencia Western utilizando un anticuerpo dirigido contra el epítipo FLAG.

- 60

La figura 4 presenta una ilustración esquemática de los casetes de expresión utilizados (panel A). Dicha figura también muestra, a través del ejemplo del alérgeno de ácaro Der p 2, las ventajas cualitativas ligadas a la utilización de señales

- 65

de Reozyme™. En efecto, en el panel B, análisis por transferencia Western ilustran las diferencias de calidad del alérgeno Der p 2 producido en fusión con las diferentes señales de Reozyme™. El alérgeno se produce en forma heterogénea y presenta una masa molecular no conforme cuando se utilizan las señales R1, R2 y R3 de Reozyme™. En cambio, cuando se utiliza la señal R4 el alérgeno recombinante es homogéneo y presenta una masa molecular idéntica a la del alérgeno natural.

Ejemplo 3: El procedimiento según la invención permite obtener un rendimiento más elevado

Para este ejemplo, la utilización del vector pAG01 junto con la utilización del procedimiento descrito en la invención se comparó con la utilización de un vector binario (-/+ inhibidor de silenciamiento) junto con los métodos clásicos de transfección descritos, por ejemplo, en Medrano *et al* (2009).

El ADNc que codifica el alérgeno Der p 7 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, se clonó en el vector pAG01, o en el vector pBI121. A continuación estos vectores se introdujeron las agrobacterias (cepa LBA4404) a fin de efectuar la expresión transitoria en *N. benthamiana*.

Después, las cepas de agrobacterias se utilizaron para transfectar plantas cultivadas bien en hidroponia sobre placas flotantes, como se describen los ejemplos 1 y 2, o bien cultivadas en tierra y después infiltradas al vacío según un protocolo clásico como el publicado en Pogue *et al* (2010).

Como se ilustra en la figura 5, las condiciones de los cultivos de las plantas descritas en el procedimiento, así como la utilización del vector pAG01, permiten obtener rendimientos más elevados en cuanto a alérgenos recombinantes que los observados con las condiciones generalmente utilizadas para la expresión transitoria.

En la figura 5 parece evidente que los rendimientos del procedimiento según la invención son sobradamente superiores a los obtenidos con un procedimiento clásico. Además, los inventores ponen de manifiesto una mejor homogeneidad de los diferentes sucesos de transformación, como se ilustra en los carriles 7 a 9, en comparación con los carriles 4 a 6.

Los niveles de expresión más elevados observados para Der p 7 se explican en parte por las condiciones de agroinfiltración según el procedimiento de la invención. En efecto, como se ilustra en la figura 6, la infiltración de los tejidos foliares es más eficaz, tal y como se describe en el procedimiento. En esta figura, los inventores compararon la expresión de la GFP: 1) cuando la agroinfiltración se efectuaba según el protocolo descrito en la invención (panel B), o 2) cuando la infiltración se efectuaba según un método de infiltración clásico (panel A) descrito, por ejemplo, en Medrano *et al* (2009).

Ejemplo 4: El procedimiento según la invención permite realizar una purificación fácil

Se recogieron hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana*, y las proteínas se extrajeron triturando este material vegetal en un tampón fosfato completado en NaCl (0,1 M), pH 7,5. Después de una filtración rápida, el extracto se depositó sobre una columna de níquel inmovilizado. Las proteínas del extracto que no presentan afinidad por la matriz de cromatografía no quedan retenidas sobre la columna. En cambio, los alérgenos recombinantes producidos según el procedimiento, presentan una etiqueta de seis histidinas y quedan retenidos sobre este tipo de matriz. Después de lavar la columna para eliminar las proteínas contaminantes, los alérgenos se eluyen específicamente en presencia de imidazol 50 mM en el tampón fosfato.

El procedimiento de producción según la invención es flexible y fácilmente adaptable a la producción de cualquier alérgeno de interés. Esto no solo se cumple en las técnicas de cultivo, clonación, agroinfiltración, extracción, sino también en las de purificación.

En efecto, gracias a la fusión de una etiqueta, la purificación de alérgenos recombinantes está estandarizada. Esto se ilustra en la figura 7, que presenta el análisis por SDS-PAGE y la transferencia Western de etapas de purificación del alérgeno Der p 4 producido como se describe en la invención. Este análisis ilustra el procedimiento de purificación de este alérgeno en dos etapas de cromatografía:

1) afinidad sobre columna de níquel inmovilizado (IMAC) y 2) tamizado molecular.

Carril 1: Extracto proteico total.

Carril 2: Der p 4 purificado sobre la columna de níquel inmovilizado (IMAC) y eluido en presencia de imidazol 50 mM

Carril 3: Der p 4 purificado por tamizado molecular después de la etapa IMAC.

Carril 4: Der p 4 purificado y por tanto la etiqueta se ha escindido *in vitro*.

Panel superior: análisis de Der p 4 por SDS-PAGE seguido de una tinción de proteínas con azul de Coomassie en el gel.

Panel inferior: Análisis de Der p 4 por SDS-PAGE seguido de transferencia western e inmunodetección sobre el molde con un suero inmuno específico de etiqueta de purificación

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ANGANY GENETICS

5 <120> Método de producción de alérgenos recombinantes de alta calidad para la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*
<130> BCT130167 QT

<160>21

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal

20 <400> 1

Met	Thr	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile
1				5					10			

<210>2

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> péptido señal

<400>2

Met	Ala	Arg	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala
1				5					10

<210>3

35 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> péptido señal

<400> 3

Met	Asn	Asp	Arg	Arg	Pro	Gln	Arg	Lys	Arg	Pro	Ala
1				5					10		

<210>4

<211> 150

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> péptido señal

<400> 4

ES 2 700 743 T3

```

Met Thr Gly Ala Ser Arg Arg Ser Ala Arg Gly Arg Ile Lys Ser Ser
1          5          10          15

Ser Leu Ser Pro Gly Ser Asp Glu Gly Ser Ala Tyr Pro Pro Ser Ile
          20          25          30

Arg Arg Gly Lys Gly Lys Glu Leu Val Ser Ile Gly Ala Phe Lys Thr
          35          40          45

Asn Leu Lys Ile Leu Val Gly Leu Ile Ile Leu Gly Ile Ile Val Ile
50          55          60

Tyr Phe Val Ile Asn Arg Leu Val Arg His Gly Leu Leu Phe Asp Glu
65          70          75          80

Ser Gln Lys Pro Arg Val Ile Thr Pro Phe Pro Ala Pro Lys Val Met
          85          90          95

Asp Leu Ser Met Phe Gln Gly Glu His Lys Glu Ser Leu Tyr Trp Gly
          100          105          110

Thr Tyr Arg Pro His Val Tyr Phe Gly Val Arg Ala Arg Thr Pro Leu
          115          120          125

Ser Leu Val Ala Gly Leu Met Trp Leu Gly Val Lys Asp Glu Met Tyr
130          135          140

Val Met Arg His Phe Cys
145          150

```

<210>5
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido señal

<400> 5

```

Met Ala Arg Gly Ser Arg Ser Val Gly Ser Ser Ser Ser Lys Trp Arg
1          5          10          15

Tyr Cys Asn Pro Ser Tyr Tyr Leu Lys Arg Pro Lys Arg Leu Ala Leu
          20          25          30

Leu Phe Ile Val Phe Val Cys Val Ser Phe Val Phe Trp Asp Arg Gln
          35          40          45

```

<210>6
 <211> 99

ES 2 700 743 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido señal

<400>6

Met	Ala	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Trp	Arg
1				5					10					15	
Tyr	Cys	Asn	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Ala	Leu
			20					25					30		
Leu	Phe	Ile	Val	Phe	Val	Cys	Val	Ser	Phe	Val	Phe	Trp	Asp	Arg	Gln
		35					40					45			
Thr	Leu	Val	Arg	Glu	His	Gln	Val	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Gln	Lys	Glu
	50					55					60				
Val	Thr	Asp	Leu	Lys	Asn	Leu	Val	Asp	Asp	Leu	Asn	Asn	Lys	Gln	Gly
65					70					75					80
Gly	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr	Asp	Leu	Gly	Arg	Lys	Ala	Thr	Lys	Ser	Ser
				85					90					95	
Lys Asp Val															

10 <210>7
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> péptido señal

<400> 7

Met	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Phe	Val	Cys	Val	Ser
1				5					10					15	
Phe	Val	Phe	Trp	Asp	Arg										
			20												

20 <210>8
<211> 68
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> péptido señal

<400>8

ES 2 700 743 T3

Met Gly Val Phe Ser Asn Leu Arg Gly Pro Arg Ala Gly Ala Thr His
1 5 10 15

Asp Glu Phe Pro Ala Thr Asn Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Pro
20 25 30

Ser Ser Ser Ile Lys Arg Lys Leu Ser Asn Leu Leu Pro Leu Cys Val
35 40 45

Ala Leu Val Val Ile Ala Glu Ile Gly Phe Leu Gly Arg Leu Asp Lys
50 55 60

Val Ala Thr Ser
65

<210>9
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 9

Met Arg Gly Tyr Lys Phe Cys Cys Asp Phe Arg Tyr Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Ile Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln
20 25 30

Ser Glu Tyr Ala Asp Arg
35

<210> 10
<211> 68
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 10

ES 2 700 743 T3

Met Gly Val Phe Ser Asn Leu Arg Gly Pro Lys Ile Gly Leu Thr His
1 5 10 15

Glu Glu Leu Pro Val Val Ala Asn Gly Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser
20 25 30

Pro Ser Ser Phe Lys Arg Lys Val Ser Thr Phe Leu Pro Ile Cys Val
35 40 45

Ala Leu Val Val Ile Ile Glu Ile Gly Phe Leu Cys Arg Leu Asp Asn
50 55 60

Ala Ser Thr Ser
65

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 11

Met Leu Val Met Pro Gln Pro Pro Lys Pro Phe Asn Thr Ile Thr Ile
1 5 10 15

Thr Ile Met Ile Ala Phe Thr Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Gly Phe
20 25 30

Leu Gln Phe Pro Ser Ile Ser Pro Ser
35 40

<210> 12
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 12

ES 2 700 743 T3

Met Ala Arg Gly Ser Arg Ser Val Gly Ser Ser Ser Ser Lys Trp Arg
1 5 10 15

Tyr Cys Asn Pro Ser Tyr Tyr Leu Lys Arg Pro Lys Arg Leu Ala Leu
20 25 30

Leu Phe Ile Val Phe Val Cys Val Ser Phe Val Phe Trp Cys Val Ser
35 40 45

Phe Val Phe Trp Asp Arg Gln Thr Leu Val Arg Glu His Gln Val Glu
50 55 60

Ile Ser Glu Leu Gln Lys Glu Val Thr Asp Leu Lys Asn Leu Val Asp
65 70 75 80

Asp Leu Asn Asn Lys Gln Gly Gly Thr Ser Gly Lys Thr Asp Leu Gly
85 90 95

Arg Lys Ala Thr Lys Ser Ser Lys Asp Val
100 105

<210> 13

<211>21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 13

Xaa Xaa Xaa Leu Ala Leu Leu Phe Ile Val Phe Val Cys Val Ser Phe
1 5 10 15

Val Phe Trp Asp Arg
20

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido señal

<220>

<221 > misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 14

ES 2 700 743 T3

Xaa Xaa Arg Tyr Leu Leu Ile Leu Ala Ala Val Ala Phe Ile Tyr Ile
1 5 10 15

Gln Met Arg Leu Phe Ala Thr Gln Ser
20 25

<210> 15
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221 > misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Leu Gly Ile Leu Phe Ala Val Thr Leu Ser Ile Val Leu
1 5 10 15

Met Leu Val Ser Val Xaa Xaa Xaa
20

<210> 16
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

<220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 16

Xaa Xaa Lys Ile Phe Leu Tyr Met Leu Leu Leu Asn Ser Leu Phe Leu
1 5 10 15

Ile Ile Tyr Phe Val Phe His
20

<210> 17
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal

ES 2 700 743 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <400> 17
 Xaa Xaa Xaa Arg Lys Leu Ser Asn Leu Leu Pro Leu Cys Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ala Glu Ile Gly Phe Leu Gly
 20 25
 10
 <210> 18
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido señal
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 20
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 18
 Xaa Xaa Xaa Arg Lys Val Ser Thr Phe Leu Pro Ile Cys Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ile Glu Ile Gly Phe Leu Cys
 20 25
 25
 <210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> péptido señal
 <220>
 <221> misc_feature
 35
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_feature
 40
 <222> (28)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 19
 Xaa Xaa Phe Asn Thr Ile Thr Ile Thr Ile Met Ile Ala Phe Thr Phe
 1 5 10 15
 Phe Leu Leu Phe Leu Thr Gly Phe Leu Gln Phe Xaa Xaa
 20 25
 45

ES 2 700 743 T3

<210> 20
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido señal
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<400> 20
 Xaa Xaa Lys Arg Leu Ala Leu Leu Phe Ile Val Phe Val Cys Val Ser
 1 5 10 15
 Phe Val Phe Trp Cys Val Ser Phe Val Phe Trp Asp Arg
 20 25

15

<210>21
 <211> 12295
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> plásmido pAG01
 <400> 21

tgagcgtcgc aaaggcgctc ggtcttgcct tgctcgtcgg tgatgtactt caccagctcc	60
gcgaagtgcg tcttcttgat ggagcgcatg gggacgtgct tggcaatcac gcgcaccccc	120
cggccgtttt agcgggctaaa aaagtcattg ctctgccctc gggcggacca cggccatcat	180
gaccttgcca agctcgtcct gcttctcttc gatcttcgcc agcagggcga ggatcgtggc	240
atcaccgaac cgcgcctgct gcgggctcgt ggtgagccag agtttcagca ggccgcccag	300
gcggcccagg tcgccattga tcggggccag ctgcgggacg tgctcatagt ccacgacgcc	360
cgtgattttg tagccctggc cgacggccag caggtaggcc gacaggctca tgccggccgc	420
cggcgctttt tcctcaatcg ctcttcgttc gtctggaagg cagtacacct tgataggtgg	480
gctgcccttc ctggttggct tggtttcata agccatccgc ttgccctcat ctgttacgcc	540
ggcggtagcc ggccagcctc gcagagcagg attcccgttg agcaccgcca ggtgcgaata	600
agggacagtg aagaaggaac acccgctcgc ggggtgggcct acttcaccta tcctgcccgg	660
ctgacgccgt tggatacacc aaggaaagtc tacacgaacc ctttggcaaa atcctgtata	720
tcgtgcgaaa aaggatggat ataccgaaa aatcgctata atgaccccga agcagggtta	780
tgcagcggaa aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagcg	840

25

ES 2 700 743 T3

gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	900
atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgctc	atTTTTgtga	tgctcgtcag	960
gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1020
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaacgta	1080
ttaccgcctt	tgagtgagct	gataaccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1140
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgccaga	aggccgccag	agaggccgag	cgcggccgtg	1200
aggcttggac	gctagggcag	ggcatgaaaa	agcccgtagc	gggctgctac	gggcgtctga	1260
cgcggtggaa	agggggaggg	gatgttgtct	acatggctct	gctgtagtga	gtgggttgcg	1320
ctccggcagc	ggtcctgatc	aatcgtcacc	ctttctcggg	ccttcaacgt	tcctgacaac	1380
gagcctcctt	ttcgccaatc	catcgacaat	caccgcgagt	ccctgctcga	acgtgcgtc	1440
cggaccggct	tcgtcgaagg	cgtctatcgc	ggcccgcAAC	agcggcgaga	gcggagcctg	1500
ttcaacggtg	ccgccgcgct	cgccggcatc	gctgtcgccg	gcctgctcct	caagcacggc	1560
cccaacagtg	aagtagctga	ttgtcatcag	cgcattgacg	gcgtccccgg	ccgaaaaacc	1620
cgcctcgcag	aggaagcgaa	gctgcgcgtc	ggccggtttc	atctgcggtg	cgcccggtcg	1680
cgtgccggca	tgatgcgcg	cgccatcgcg	gtaggcgagc	agcgccctgcc	tgaagctgcg	1740
ggcattcccc	atcagaaaatg	agcgccagtc	gtcgtcggct	ctcggcaccg	aatgcgtatg	1800
attctccgcc	agcatggctt	cggccagtgc	gtcgcgcagc	gcccgcttgt	tcctgaagtg	1860
ccagtaaagc	gccggctgct	gaacccccaa	ccgttccgcc	agtttgcggtg	tcgtcagacc	1920
gtctacgccg	acctcgttca	acaggccag	ggcggcacgg	atcactgtat	tcggctgcaa	1980
ctttgtcatg	cttgacactt	tatcactgat	aaacataata	tgtccaccaa	cttatcagtg	2040
ataaagaatc	cgcgcgttca	atcggaccag	cggaggctgg	tccggaggcc	agacgtgaaa	2100
cccaacatac	ccctgatcgt	aattctgagc	actgtcgcgc	tcgacgctgt	cggcatcggc	2160
ctgattatgc	cgggtgctgcc	gggcctcctg	cgcgatctgg	ttcactcgaa	cgacgtcacc	2220
gccactatg	gcattctgct	ggcgtgttat	gcgttggtgc	aatttgccctg	cgcacctgtg	2280
ctgggcgcgc	tgtcggatcg	tttcgggcgg	cggccaatct	tgctcgtctc	gctggccggc	2340
gccagatctg	gggaaccctg	tggttggcat	gcacatacaa	atggacgaac	ggataaacct	2400
tttcacgccc	ttttaaatat	ccgattattc	taataaacgc	tcttttctct	taggtttacc	2460
cgccaatata	tcctgtcaaa	cactgatagt	ttaaactgaa	ggcgggaaac	gacaatctga	2520
tcatgagcgg	agaattaagg	gagtcacgtt	atgacccccg	ccgatgacgc	gggacaagcc	2580
gttttacgtt	tggaactgac	agaaccgcaa	cgttgaaagga	gccactcagc	cgcgggtttc	2640
tggagtttaa	tgagctaagc	acatacgtca	gaaaccatta	ttgcgcgttc	aaaagtcgcc	2700

ES 2 700 743 T3

taaggtcact atcagctagc aaatatttct tgtcaaaaat gctccactga cgttccataa	2760
attcccctcg gtatccaatt agagtctcat attcactctc aatccaaata atctgcaccg	2820
gatctggatc gtttcgcgtg cacaaaaatg gaacgagcta tacaaggaaa cgacgctagg	2880
gaacaagcta acagtgaacg ttgggatgga ggatcaggag gcaccacttc tcccttcaaa	2940
cttcctgacg aaagtccgag ttggactgag tggcggctac ataacgatga gacgaactcg	3000
aatcaagata atccccttgg tttcaaggaa agctgggggtt tcgggaaagt tgtatttaag	3060
agatatctca gatacgacag gacggaagcc tctactgcaca gagtccttgg atcttggacg	3120
ggagattcgg ttaactatgc agcatctcga tttttcgggtt tcgaccagat cggatgtacc	3180
tatagtattc ggtttcgagg agttagtatc accgtttctg gagggtcgcg aactcttcag	3240
catctctgtg agatggcaat tcggtctaag caagaactgc tacagcttgc cccaatcgaa	3300
gtggaaagta atgtatcaag aggatgcctt gaaggtactg agaccttcga aaaagaaagc	3360
gagtaagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccatat cttgctgcgt tcggatattt	3420
tcgtggagtt cccgccacag acccgatga tcccctaatt cgggggatct ggattttagt	3480
actggatttt ggtttttaga attagaaatt ttattgatag aagtatttta caaatacaaa	3540
tacatactaa gggtttctta tatgctcaac acatgagcga aaccctatag gaacccta	3600
tcccttatct ggaactact cacacattat tatggagaaa ctcgagcttg tcgatcgacc	3660
ctcctgtcaa tgctggcggc ggctctggtg gtggttctgg tggcggctct gaggggtggtg	3720
gctctgaggg tggcggttct gaggggtggc gctctgaggg aggcgggttc ggtggtggct	3780
ctgggtccgg tgattttgat tatgaaaaga tggcaaacgc taataagggg gctatgaccg	3840
aaaatgccga tgaacacgcg ctacagtctg acgctaaagg caaacttgat tctgtcgcta	3900
ctgattacgg tgctgctatc gatggtttca ttggtgacgt ttccggcctt gctaattgta	3960
atggtgctac tggatgattt gctggctcta attcccaa	4020
ataattcacc tttaatgaat aatttcgctc aatatttacc ttccctccct caatcggttg	4080
aatgtcgccc ttttgtcttt ggcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga	4140
ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg	4200
caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt atgcttccgg	4260
ctcgtatggt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc	4320
atgattacgc caagcttgca tgctgcagg tcccagatt agccttttca atttcagaaa	4380
gaatgctaac ccacagatgg ttagagaggc ttacgcagca ggtctcatca agacgatcta	4440
cccaggaat aatctccagg aaatcaaata ccttcccaag aaggttaaag atgcagtcaa	4500
aagattcagg actaactgca tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag	4560
tactattcca gtatggacga ttcaaggctt gcttcacaaa ccaaggcaag taatagagat	4620

ES 2 700 743 T3

tggagtctct	aaaaaggtag	ttcccactga	atcaaaggcc	atggagtcaa	agattcaa	4680
agaggaccta	acagaactcg	ccgtaaagac	tggcgaacag	ttcatacaga	gtctcttacg	4740
actcaatgac	aagaagaaaa	tcttcgtcaa	catgggtggag	cacgacacac	ttgtctactc	4800
caaaaatatc	aaagatacag	tctcagaaga	ccaaaggggca	attgagactt	ttcaacaaaag	4860
ggtaatatcc	ggaaacctcc	tcggattcca	ttgccagct	atctgtcact	ttattgtgaa	4920
gatagtggaa	aaggaaggtg	gctcctacaa	atgccatcat	tgcgataaag	gaaaggccat	4980
cgttgaagat	gcctctgccg	acagtgggtcc	caaagatgga	ccccaccca	cgaggagcat	5040
cgtggaaaaa	gaagacgttc	caaccacgtc	ttcaaagcaa	gtggattgat	gtgatatctc	5100
cactgacgta	agggatgacg	cacaatccca	ctatccttcg	caagaccctt	cctctatata	5160
aggaagtcca	tttcatttgg	agagaacacg	ggggactcta	gaggtacccg	ggccccggga	5220
tccgcggccg	cactagtcca	caggcctgag	ctcgaatttc	cccgatcggt	caaacatttg	5280
gcaataaagt	ttcttaagat	tgaatcctgt	tgccgggtctt	gcgatgatta	tcatataatt	5340
tctgttgaat	tacgttaagc	atgtaataat	taacatgtaa	tgcacgacgt	tatttatgag	5400
atgggttttt	atgattagag	tcccgcgaatt	atacatctta	tacgcgatag	aaaacaaaat	5460
atagcgcgca	aactaggata	aattatcgcg	cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcgga	5520
attcactggc	cgtcgtttta	caacgtcgtg	actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	5580
atcgcccttc	agcacatccc	cctttcgcca	gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	5640
atcgcccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	atggcgcccc	ctcctttcgc	tttcttccct	5700
tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	5760
gggttccgat	ttagtgcttt	acggcacctc	gacccccaaa	aacttgattt	gggtgatggt	5820
tcacgtagtg	ggccatcgcc	ctgatagacg	gttttttcgcc	ctttgacggt	ggagtccacg	5880
ttctttaata	gtggactctt	gttccaaaact	ggaacaacac	tcaaccctat	ctcgggctat	5940
tcttttgatt	tataagggat	tttgccgatt	tcggaaccac	catcaaacag	gatttttcgcc	6000
tgctggggca	aaccagcgtg	gaccgcttgc	tgcaactctc	tcagggccag	gcggtgaagg	6060
gcaatcagct	gttgcccgtc	tactgggtga	aaagaaaaac	caccccagta	cattaaaaaac	6120
gtccgcaatg	tggtattaag	ttgtctaagc	gtcaatttgt	ttacaccaca	atatatcctg	6180
ccaccagcca	gccaacagct	ccccgaccgg	cagctcggca	caaaatcacc	actcgataca	6240
ggcagcccat	cagtccggga	cggcgtcagc	gggagagccg	ttgtaaggcg	gcagactttg	6300
ctcatgttac	cgatgctatt	cggagaagac	gcaactaagc	tgccgggttt	gaaacacgga	6360
tgatctcgcg	gagggtagca	tggtgattgt	aacgatgaca	gagcgttgct	gcctgtgatc	6420
aaatatcatc	tccctcgag	agatccgaat	tatcagcctt	cttattcatt	tctcgcttaa	6480

ES 2 700 743 T3

ccgtgacagg	ctgtcgatct	tgagaactat	gccgacataa	taggaaatcg	ctggataaag	6540
ccgctgagga	agctgagtgg	cgctatttct	ttagaagtga	acgttgacga	tatcaactcc	6600
cctatccatt	gctcaccgaa	tggtacaggt	cggggacccg	aagttccgac	tgtcggcctg	6660
atgcatcccc	ggctgatcga	ccccagatct	ggggctgaga	aagcccagta	aggaaacaac	6720
tgtaggttcg	agtcgcgaga	tcccccgaa	ccaaaggaag	taggttaaac	ccgctccgat	6780
caggccgagc	cacgccaggc	cgagaacatt	ggttcctgta	ggcatcggga	ttggcggatc	6840
aaacactaaa	gctactggaa	cgagcagaag	tcctccggcc	gccagttgcc	aggcggtaaa	6900
ggtgagcaga	ggcacgggag	gttgccactt	gcgggtcagc	acggttccga	acgccatgga	6960
aaccgcccc	gccaggcccc	ctgcgacgcc	gacaggatct	agcgctgcgt	ttggtgtcaa	7020
caccaacagc	gccacgcccc	cagttccgca	aatagcccc	aggaccgcca	tcaatcgtat	7080
cgggctacct	agcagagcgg	cagagatgaa	cacgaccatc	agcggctgca	cagcgcctac	7140
cgtcgccgcg	accccgcccc	gcaggcggta	gaccgaaata	aacaacaagc	tccagaatag	7200
cgaaatatta	agtgcgccga	ggatgaagat	gcgcattccac	cagattcccc	ttggaatctg	7260
tcggacgatc	atcacgagca	ataaaccgac	cggcaacgcc	cgcagcagca	taccggcgac	7320
ccctcggcct	cgctgttcgg	gctccacgaa	aacgccggac	agatgcgcct	tgtgagcgtc	7380
cttggggccg	tcctcctggt	tgaagaccga	cagcccaatg	atctcgccgt	cgatgtaggc	7440
gccgaatgcc	acggcatctc	gcaaccgttc	agcgaacgcc	tccatgggct	ttttctcctc	7500
gtgctcgtaa	acggacccga	acatctctgg	agctttcttc	agggccgaca	atcggatctc	7560
gcggaaatcc	tgcacgtcgg	ccgctccaag	ccgtcgaatc	tgagccttaa	tcacaattgt	7620
caattttaat	cctctgttta	tcggcagttc	gtagagcgcg	ccgtgcgtcc	cgagcgatac	7680
tgagcgaagc	aagtgcgtcg	agcagtggcc	gcttgttcct	gaaatgccag	taaagcgctg	7740
gctgctgaac	ccccagccgg	aactgacccc	acaaggccct	agcgtttgca	atgcaccagg	7800
tcatcattga	cccaggcgtg	ttccaccagg	ccgctgcctc	gcaactcttc	gcaggcttcg	7860
ccgacctgct	cgcgccactt	cttcacgcgg	gtggaatccg	atccgcacat	gaggcggaag	7920
gtttccagct	tgagcgggta	cggctcccgg	tgcgagctga	aatagtcgaa	catccgtcgg	7980
gccgtcggcg	acagcttgcg	gtacttctcc	catatgaatt	tcgtgtagtg	gtcgccagca	8040
aacagcacga	cgatttcctc	gtcgatcagg	acctggcaac	gggacgtttt	cttgccacgg	8100
tccaggacgc	ggaagcgggtg	cagcagcgac	accgattcca	ggtgcccaac	gcggtcggac	8160
gtgaagccca	tcgccgtcgc	ctgtaggcgc	gacaggcatt	cctcggcctt	cgtgtaatac	8220
cggccattga	tcgaccagcc	caggtcctgg	caaagctcgt	agaacgtgaa	ggtgatcggc	8280
tcgccgatag	gggtgcgctt	cgcgtactcc	aacacctgct	gccacaccag	ttcgtcatcg	8340
tcggccccga	gctcgacgcc	ggtgtaggtg	atcttcacgt	ccttggtgac	gtggaaaatg	8400

ES 2 700 743 T3

accttgTTTT	gcagcgCctc	gcgcgggatt	ttcttgTtgc	gcgtggtgaa	cagggcagag	8460
cgggccgtgt	cgTTTggcat	cgctcgcatc	gtgtccggcc	acggcgcaat	atcgaacaag	8520
gaaagctgca	tttccttgat	ctgctgcttc	gtgtgtttca	gcaacgcggc	ctgcttgGCC	8580
tcgctgacct	gttttgccag	gtcctcgccg	gcggtttttc	gcttccttgg	cgtcatagtt	8640
cctcgcgTgt	cgatggTcat	cgacttcgcc	aaacctgccg	cctcctgttc	gagacgacgc	8700
gaacgctcca	cggcgGCCga	tggcgCGggc	agggcagggg	gagccagttg	cacgctgtcg	8760
cgctcgatct	tggccgtagc	ttgctggacc	atcgagccga	cggactggaa	ggtttcgCGg	8820
ggcgcacgca	tgacggtgcg	gcttgcgatg	gtttcgGcat	cctcggcgga	aaaccccgCG	8880
tcgatcagtt	cttgccTgta	tgccttcCGg	tcaaacgtcc	gattcattca	ccctccttgc	8940
gggattgccc	cgactcacgc	cggggcaatg	tgcccttatt	cctgatttga	ccgcctggt	9000
gccttggtgt	ccagataatc	caccttatcg	gcaatgaagt	cggTcccgtA	gaccgtctgg	9060
ccgtccttct	cgtacttggt	attccgaatc	ttgccctgca	cgaataccag	cgaccccttg	9120
cccaaatact	tgccgtgggc	ctcggcctga	gagccaaaac	acttgatgcg	gaagaagtcg	9180
gtgcgctcct	gcttgTcgcc	ggcatcgTtg	cgccacatct	aggtactaaa	acaattcatc	9240
cagtaaaata	taatatttta	ttttctccca	atcaggcttg	atccccagta	agtcaaaaaa	9300
tagctcgaca	tactgttctt	ccccgatatc	ctccctgata	gaccggacgc	agaaggcaat	9360
gtcataccac	ttgtccgccc	tgcgcTtct	cccaagatca	ataaagccac	ttactttgcc	9420
atctttcaca	aagatgttgc	tgtctcccag	gtcgccgtgg	gaaaagacaa	gttcctcttc	9480
gggcttttcc	gtctttaaaa	aatcatacag	ctcgcgCGga	tctttaaatg	gagtgtcttc	9540
ttcccagttt	tcgcaatcca	catcgGCCag	atcgTtattc	agtaagtaat	ccaattcggc	9600
taagcggctg	tctaagctat	tcgtataggg	acaatccgat	atgtcgatgg	agtgaagag	9660
cctgatgcac	tcgcgataca	gctcgataat	cttttcaggg	ctttgttcat	cttcatactc	9720
ttccgagcaa	aggacgccat	cggcctcact	catgagcaga	ttgctccagc	catcatgccg	9780
ttcaaagtgc	aggacctttg	gaacaggcag	ctttccttcc	agccatagca	tcatgtcctt	9840
ttcccgttcc	acatcatagg	tggTcccttt	ataccggctg	tccgtcattt	ttaaatatag	9900
gttttcattt	tctcccacca	gcttatatac	cttagcagga	gacattcctt	ccgtatcttt	9960
tacgcagcgg	tattttttcg	tcagtTTTTt	caattccggt	gatattctca	ttttagccat	10020
ttattatttc	cttcctcttt	tctacagtat	ttaaagatac	cccaagaagc	taattataac	10080
aagacgaact	ccaattcact	gttccttgca	ttctaaaacc	ttaaatacca	gaaaacagct	10140
ttttcaaagt	tgttttcaaa	gttggcgTat	aacatagtat	cgacggagcc	gattttgaaa	10200
ccacaattat	gggtgatgct	gccaaacttac	tgatttagtg	tatgatggTg	tttttgaggT	10260

ES 2 700 743 T3

gctccagtgg	cttctgtgtc	tatcagctgt	ccctcctgtt	cagctactga	cggggtggtg	10320
cgtaacggca	aaagcaccgc	cggacatcag	cgctatctct	gctctcactg	ccgtaaaaca	10380
tggcaactgc	agttcactta	caccgcttct	caacccggta	cgcaccagaa	aatcattgat	10440
atggccatga	atggcggttg	atgccgggca	acagcccgca	ttatgggcgt	tggcctcaac	10500
acgattttac	gtcacttaaa	aaactcaggc	cgcagtcggt	aacctcgcgc	atacagccgg	10560
gcagtgacgt	catcgtctgc	gcggaaatgg	acgaacagtg	gggctatgtc	ggggctaaat	10620
cgcgccagcg	ctggctgttt	tacgcgtatg	acagtctccg	gaagacgggt	gttgcgcacg	10680
tattcggtga	acgcactatg	gcgacgctgg	ggcgtcttat	gagcctgctg	tcaccctttg	10740
acgtggtgat	atggatgacg	gatggctggc	cgctgtatga	atcccgctg	aagggaaagc	10800
tgcacgtaat	cagcaagcga	tatacgcagc	gaattgagcg	gcataacctg	aatctgaggg	10860
agcacctggc	acggctggga	cggaaagtgc	tgtcgttctc	aaaatcgggtg	gagctgcatg	10920
acaaagtcat	cgggcattat	ctgaacataa	aacactatca	ataagttgga	gtcattaccc	10980
aattatgata	gaatttacia	gctataaggt	tattgtcctg	ggtttcaagc	attagtcctat	11040
gcaagttttt	atgctttgcc	cattctatag	atatattgat	aagcgcgctg	cctatgcctt	11100
gccccctgaa	atccttacat	acggcgatat	cttctatata	aaagatatat	tatcttatca	11160
gtattgtcaa	tatattcaag	gcaatctgcc	tcctcatcct	cttcatcctc	ttcgtcttgg	11220
tagcttttta	aatatggcgc	ttcatagagt	aattctgtaa	aggtccaatt	ctcgttttca	11280
tacctcggtg	taatcttacc	tatcacctca	aatgggtcgc	tgggtttatc	gcacccccga	11340
acacgagcac	ggcaccgcgc	accactatgc	caagaatgcc	caaggtaaaa	attgccggcc	11400
cggccatgaa	gtccgtgaat	gccccgacgg	ccgaagtga	gggcaggccg	ccaccagggc	11460
cgcgcacctc	actgccccgc	acctggctgc	tgaatgtcga	tgccagcacc	tgccggcacgt	11520
caatgcttcc	gggcgtcgcg	ctcgggctga	tcgcccatcc	cgttactgcc	ccgatcccg	11580
caatggcaag	gactgccagc	gctgccatth	ttgggggtgag	gccgttcgcg	gccgaggggc	11640
gcagccccctg	gggggatggg	aggcccgct	tagcggggccg	ggaggggttcg	agaagggggg	11700
gcacccccct	tcggcgtgcg	cggtcacgcg	cacagggcgc	agccctggtt	aaaaacaagg	11760
tttataaata	ttggtttaaa	agcaggttaa	aagacaggtt	agcggtgggc	gaaaaacggg	11820
cggaaaccct	tgcaaatgct	ggattttctg	cctgtggaca	gcccctcaaa	tgtcaatagg	11880
tgcgccccctc	atctgtcagc	actctgcccc	tcaagtgtca	aggatcgcgc	ccctcatctg	11940
tcagtagtcg	cgcacctcaa	gtgtcaatac	cgcagggcac	ttatccccag	gcttgtccac	12000
atcatctgtg	ggaaactcgc	gtaaaatcag	gcgttttcgc	cgatttgcca	ggctggccag	12060
ctccacgtcg	ccggccgaaa	tcgagcctgc	ccctcatctg	tcaacgccgc	gcggggtgag	12120
tcggccccctc	aagtgtcaac	gtccgccccct	catctgtcag	tgagggccaa	gttttcgcgc	12180

ES 2 700 743 T3

aggtatccac aacgccggcg gccgcggtgt ctcgcacacg gcttcgacgg cgtttctggc	12240
gcgtttgcag ggccatagac ggccgccagc ccagcggcga gggcaaccag cccgg	12295

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un alérgeno recombinante en una planta de tabaco *Nicotiana benthamiana*, que comprende las siguientes etapas:

- a) el cultivo de la planta en aeroponía o en hidroponía, preferentemente sobre flotadores móviles, y con luz LED, y después
- b) la agroinfiltración de la planta obtenida en la etapa a), al vacío, por agrobacterias que comprenden el vector de expresión pAG01 de secuencia SEQ ID NO 21, comprendiendo dicho vector un fragmento de ADN que codifica la proteína recombinante, y después
- c) volver a cultivar las plantas después de la etapa b), en las mismas condiciones que las de la etapa a), y después
- d) la extracción y la purificación del alérgeno recombinante a partir de las partes aéreas de las plantas producidas en la etapa c).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el alérgeno recombinante es un alérgeno recombinante de acárido.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** el alérgeno recombinante se selecciona entre los alérgenos de *Dermatophagoides farinae*, los alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, los alérgenos de *Euroglyphus manei*, los alérgenos de *Acarus siro*, los alérgenos de *Blomia tropicalis*, los alérgenos de cucarachas, los alérgenos de pólenes de árboles o de gramíneas, los alérgenos de animales, los alérgenos de hongos, los alérgenos del látex de Hevea y los alérgenos responsables de alergias alimentarias.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el alérgeno recombinante se selecciona entre Der f 10, Der f 11, Der f 13, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18, Der f 2, Der f 2.0101, Der f 2.0102, Der f 2.0103, Der f 2.0104, Der f 2.0105, Der f 2.0106, Der f 2.0107, Der f 2.0108, Der f 2.0109, Der f 2.0110, Der f 2.0111, Der f 2.0112, Der f 2.0113, Der f 2.0114, Der f 2.0115, Der f 2.0116, Der f 2.0117, Der f 20, Der f 3, Der f 4, Der f 5, Der f 6, Der f 7, Der f 8, Der f 9 y Der f HSP70.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el alérgeno recombinante se selecciona entre Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 2, Der p 2.0101, Der p 2.0102, Der p 2.0103, Der p 2.0104, Der p 2.0105, Der p 2.0106, Der p 2.0107, Der p 2.0108, Der p 2.0109, Der p 2.0110, Der p 2.0111, Der p 2.0112, Der p 2.0113, Der p 20, Der p 21, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8 y Der p 9.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el alérgeno recombinante se selecciona entre Blo t 1, Blo t 5, Blo t 9, Blo t 10, Blo t 12 y Blo t 21.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** la agroinfiltración se realiza al vacío por efecto Venturi.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por que** la agroinfiltración se realiza mediante una etapa de poner al vacío la planta durante 2 minutos, o de poner al vacío, preferentemente a -0,8 bar durante 2 minutos, a continuación quitar el vacío y regresar a la presión atmosférica, preferentemente durante 30 segundos, y después poner al vacío, preferentemente a -0,8 bar durante 2 minutos, seguido finalmente del regreso a la presión atmosférica.

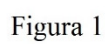
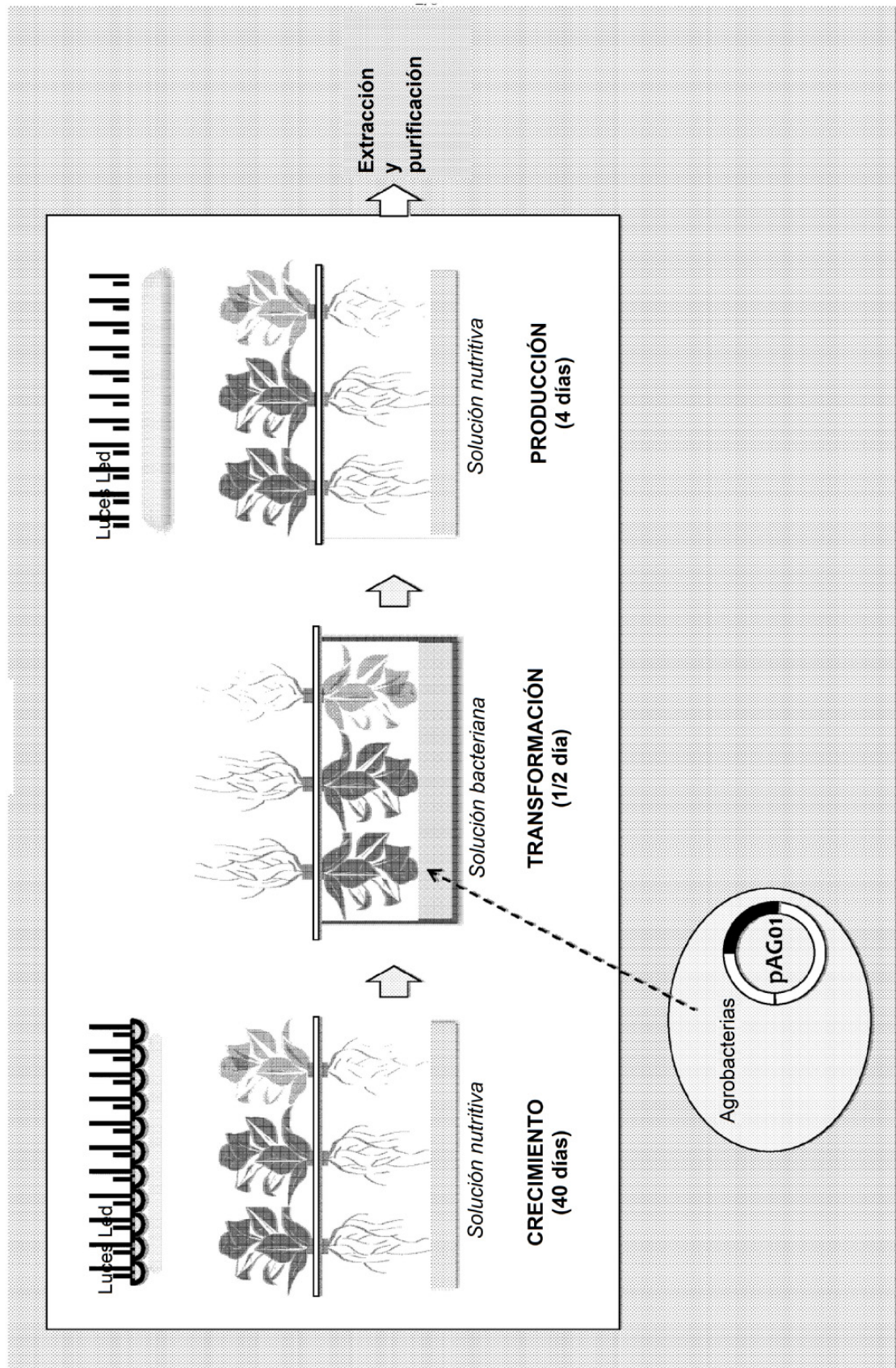


Figura 2



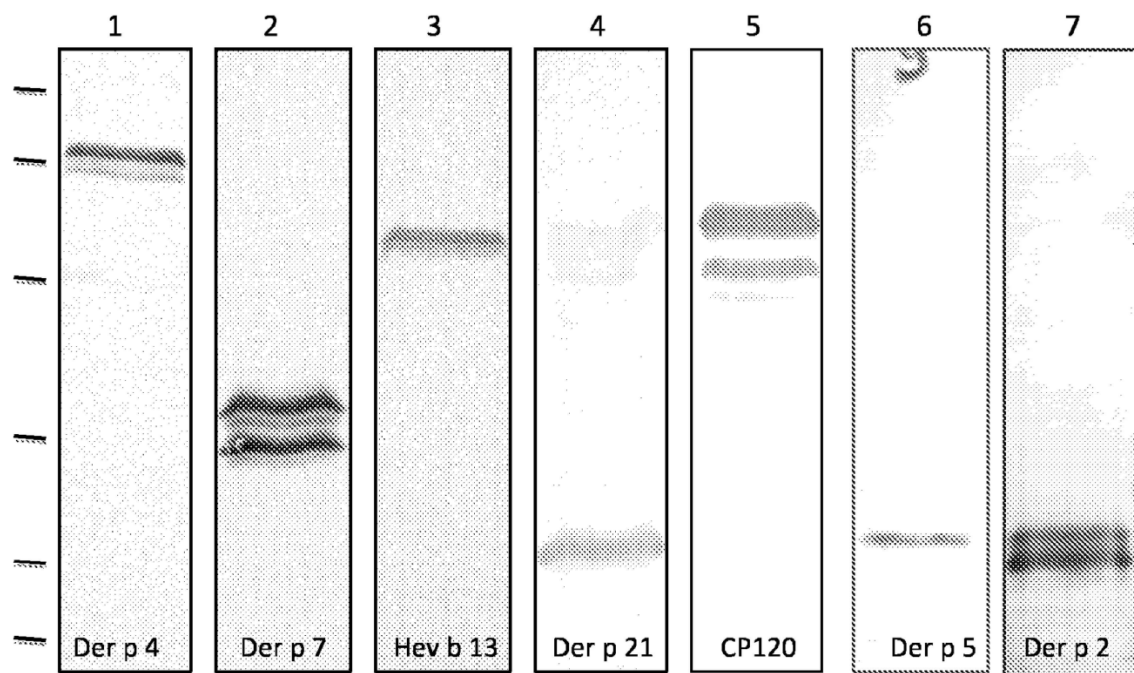
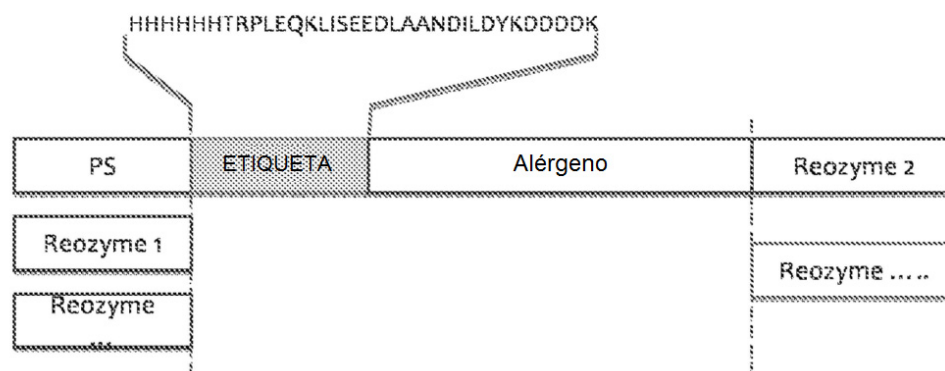


Figura 3

A



B

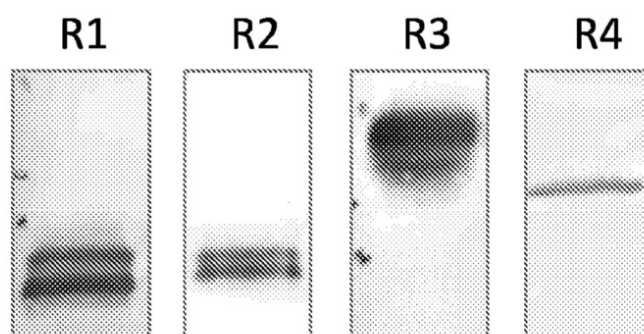


Figura 4

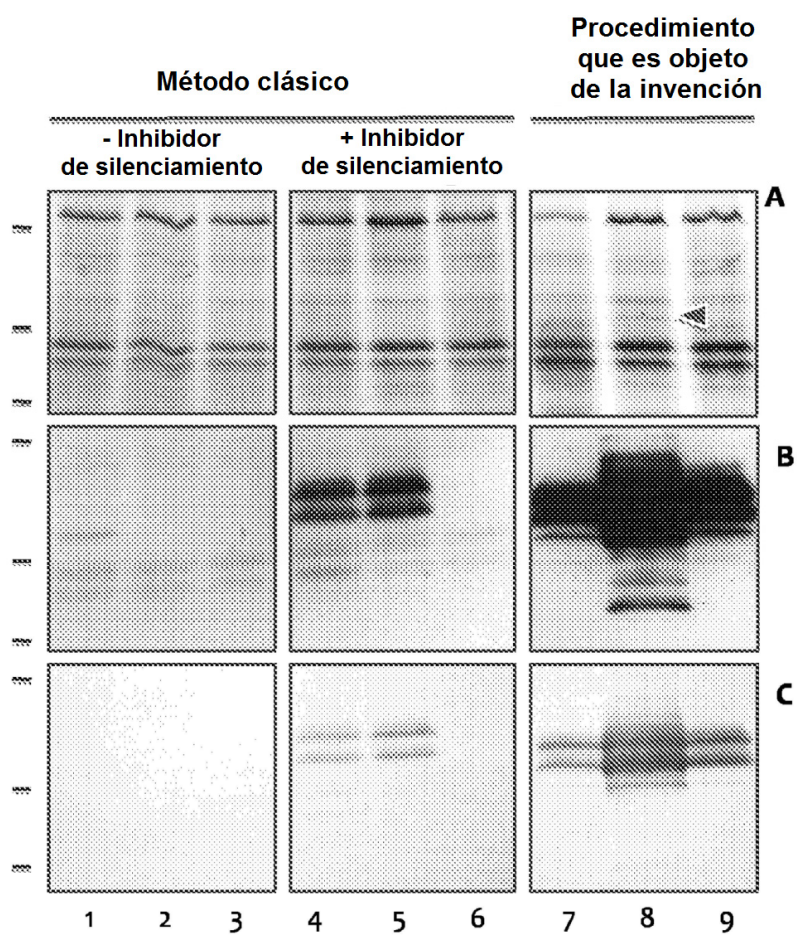


Figura 5

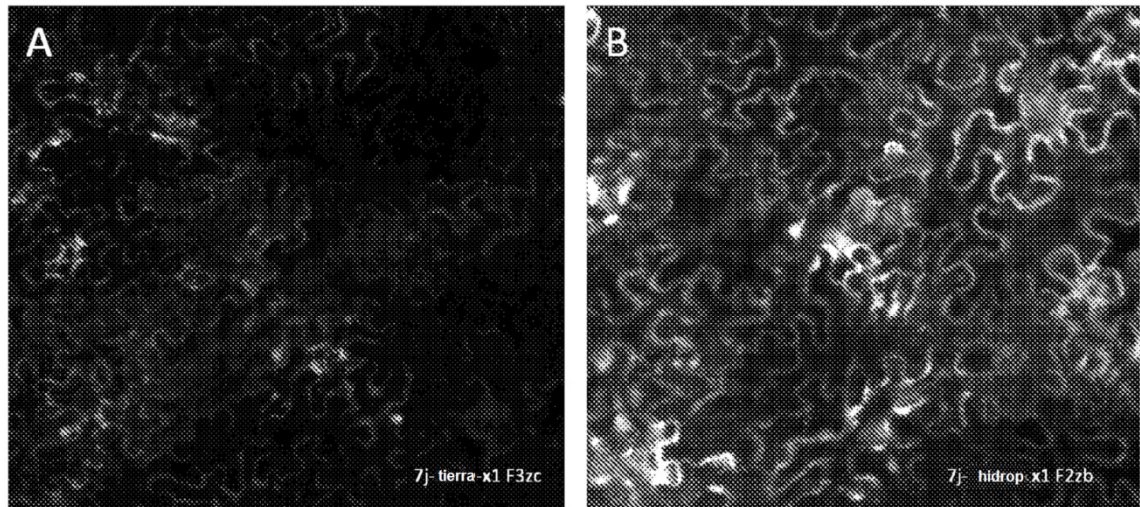


Figura 6

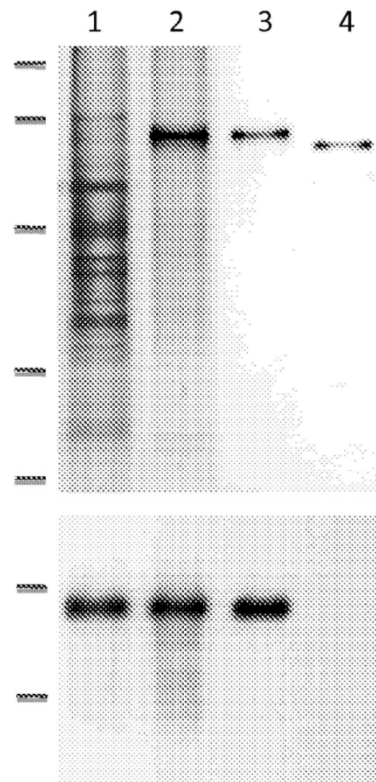


Figura 7

Figura 8

Reozyme (SEQ ID NO:)	Secuencia	LOCALIZACIÓN
1	MTGASRRSARGRI	RE
2	MARGERRRRRA	RE
3	MNDRRPQRRPA	RE
4	MTGASRRSAR GRIKSSSLSP GSDEGSAYPP SIRRKGKEL VSIGAFKTNL KILVGLIILG IIVIYFVINR 5LVRHGLLFDE SQKPRVITPF PAPKMDLSM FQGEHKESLY WGTYPHVVYF GVRARTPLSL V6AGLMWLVGK DEMYVMRHFC	RE
5	MARGSRVGS SSSKWRYCNP SYYLKRPKRL ALLFIVFCV SFVFWDRQT	RE+AG
	MARGSRVGS SSSKWRYCNP SYYLKRPKRL ALLFIVFCV SFVFWDRQTL VREHQVEISE LQKEVTDLKN LVDDLNNKQG GTSGKTDLGR KATKSSKDV	RE+AG
7	MAAALALLFIVFCVSFVFWDR	RE+AG
8	MGVFSNLRGP RAGATHDEFP ATNGSPSSSS SPSSSIKRKL SNLLPLCVAL VVIAEIGFLG RLDKVATS	RE+AG
9	MRGYKFCCDF RYLLILAABA FIYQMRIFA TQSEYADR	RE+AG
10	MGVFSNLRGP KIGLTHEELP VVANGSTSSS SSPSSFKRKV STFLPICVAL VVIIIGFLC RLDNASTS	Golgi cisterna media
11	MLVMPQPPKP FNTITITIMI AFTFFLLFLT GFLQFPSISP S	Golgi cisterna trans
12	MARGSRVGS SSSKWRYCNP SYYLKRPKRL ALLFIVFCV SFVFWCVSFV FVDRQTLVRE HQVEISELQK EVTDLKNLVD DLNNKQGGTS GKTDLGRKAT KSSKDV	Golgi cisterna trans
13	XXXLALLFIVFCVSFVFWDR	Golgi cisterna cis
14	XXRYLLILAABAFIYQMRIFA TQSEYADR	Golgi cisterna cis
15	XXXLGI LFAVTL SIVLMLVSVXXX	Golgi cisterna media
16	XXKIFLYMLLLNSLFLIYFVH	Golgi cisterna media
7	XXXRKLSNLLPLCVALVIAEIGFLG	Golgi cisterna cis
18	XXXRKVSTFLPICVALVIIIGFLC	Golgi cisterna media
19	XXFNTITITIMIAFTFFLLLTGFLQFXX	Golgi cisterna trans
20	XXKRLALLFIVFCVSFVFWCVSFVFWDR	Golgi cisterna trans