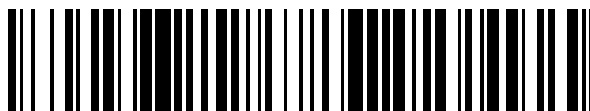


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 035**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2014** **PCT/FR2014/050916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014** **WO14170597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2014** **E 14722279 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 2986728**

54 Título: **Producción comercial de peptidasas C1A mediante expresión transitoria en plantas**

30 Prioridad:

15.04.2013 FR 1353386

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

23.12.2019

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;
CATALA, VIRGINIE y
FAYE, LOÏC

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 736 035 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

Producción comercial de peptidasas C1A mediante expresión transitoria en plantas

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a una célula vegetal que comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, para expresar en la planta, mediante expresión transitoria, una peptidasa C1A madura y activa.

Estado de la técnica

Las proteasas ocupan un lugar destacado en el mercado mundial de enzimas, estimado en alrededor de 3 mil millones de dólares estadounidenses (Leary et al., 2009, Mar Policy 33, 183-194), porque juegan un papel importante en la biotecnología. En efecto, por una parte, las proteasas intervienen como moléculas de interés, como tales; por otra parte, permiten realizar escisiones proteolíticas que modifican las propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas de las proteínas. De esta manera, las proteasas son algunas de las enzimas más importantes, debido a sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (cervecera, cárnica, productos lácteos, suero lácteo), farmacéutica y de detergentes (Doran, 2002, Plant biotechnology and transgenic plants. Nueva York; Mercel Dekker inc.; 143-163).

Entre las proteasas más utilizadas habitualmente, se encuentran las peptidasas de la familia C1A. Las peptidasas C1A (o proteasas C1A) son cisteín proteasas (CisProt), también conocidas como tiol proteasas, ampliamente distribuidas entre los organismos vivos. De esta manera se encuentran en procariotas y eucariotas (por ejemplo, bacterias, parásitos, plantas, invertebrados y vertebrados). El mecanismo catalítico de estas enzimas implica una cisteína en el sitio activo.

La papaína, una enzima vegetal, es el miembro más estudiado entre las cisteín proteasas. Una gran cantidad de CisProt se han aislado de las plantas, como la actinidina, la proteinasa w, la quimopapaína y la bromelina. Las CisProt más utilizadas son las enzimas lisosomales, tales como las caspasas, las enzimas vacuolares, tales como la papaína, la actinidina y la bromelina, y finalmente las proteasas de tipo catepsina (Palma et al., 2002, Plant Physiol. biochem, 40: 521-530).

Esta familia de proteasas es una diana potencial de fármacos para tratar enfermedades caracterizadas por una degradación excesiva de la matriz extracelular, como la osteoporosis, artritis, enfermedades vasculares y cáncer. También se han identificado como actores clave en el crecimiento, diferenciación celular, señalización, y la invasión de hospedadores por diversos patógenos humanos, en particular, parásitos patógenos que causan la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis. Finalmente, las peptidasas de la familia C1A también constituyen el grupo 1 de alérgenos y se reconocen como alérgenos principales. Por ese motivo, actualmente son una diana para el tratamiento de alergias por desensibilización (Lecaille et al., 2002, Chem Rev, 102: 4459-4488 y McKerrow et al., 2006, Annu Rev Pathol, 1: 497-536).

Las CisProt comparten características comunes. De esta manera, todas las proteasas C1A presentan puentes disulfuro necesarios para su estructura funcional; contienen una triada catalítica formada por tres restos de aminoácidos conservados (Cys, His y Asn), y un resto de Gln involucrado en el mantenimiento de la conformación de la enzima en forma activa. Las CisProt se sintetizan como precursores inactivos o poco activos (preproteínas) para impedir la proteólisis inapropiada. La preproteína comprende un péptido señal, un propéptido N-terminal de 130 a 150 aminoácidos, y la proteína madura de aproximadamente 220 a 270 aminoácidos. La activación de estas proteasas se produce o bien por la acción de enzimas de maduración, o por autocatálisis. La activación se produce por proteólisis intra o intermolecular controlada, especialmente por escisión del propéptido inhibidor (Wiederanders et al. 2003, Current Protein and Peptide Science, 4, 309-326). De esta manera, este propéptido juega un papel importante como modulador de la actividad de la proteasa, para garantizar que la proteasa madure en el lugar y/o en el momento adecuados (Demidyuk et al., 2010, J. Biol. Chem, 285, 2003-2013).

Hasta ahora, se han realizado muchos esfuerzos para expresar las CisProt en forma recombinante en una amplia variedad de sistemas de expresión (Brömme et al., 2004, Methods, 32, 199-206). A menudo estos trabajos han fracasado dada la compleja estructura de las peptidasas de la familia C1A.

Por lo tanto es necesario producir las CisProt, y en particular, las peptidasas C1A, en forma recombinante y de manera reproducible y eficaz (con un buen rendimiento). También es necesario producir peptidasas C1A a niveles aceptables desde el punto de vista comercial y económico.

Sorprendentemente, dada su toxicidad *in vivo*, los inventores han descubierto ahora que es posible la producción de peptidasas C1A en forma recombinante, mediante expresión transitoria en plantas. Esta producción, que se realiza en una célula vegetal, permite obtener una peptidasa C1A en forma madura y activa, con un buen rendimiento, de

manera muy sencilla y reproducible. Además, la peptidasa C1A obtenida no está contaminada por proteasas y/u otros contaminantes de origen animal. De esta manera, los inventores han podido obtener una producción, a niveles comercialmente aceptables, de varias peptidasas C1A.

5 Objeto de la invención

Por lo tanto, el objeto de la invención es una célula vegetal que comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S. La molécula de ADN unida al promotor fuerte permite expresar de manera transitoria una peptidasa C1A madura y activa en la célula. Preferentemente, dicha célula vegetal es una célula de *Nicotiana benthamiana*. Preferentemente, la célula vegetal según la invención comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S, no estando dicha molécula de ADN integrada en el genoma de la célula vegetal.

El objeto de la invención es también una planta que comprenda al menos una célula vegetal según la invención.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para producir una peptidasa C1A, que comprenda la expresión de dicha peptidasa C1A en una célula vegetal según la invención, o en una planta que comprenda dicha célula.

Otro objeto de la invención se refiere a una peptidasa C1A que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención. La peptidasa obtenida de esta manera puede utilizarse como un medicamento. También puede utilizarse en el diagnóstico de alergias e integrarse en un kit de diagnóstico de alergias.

La célula vegetal según la invención comprende una molécula de ADN unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S. Por "unida operativamente", se entiende que la molécula de ADN está fusionada con el promotor fuerte, de tal manera que el promotor fuerte induce la transcripción de la molécula de ADN.

Esto permite la expresión de dicha molécula de ADN en forma transitoria, es decir, sin integración del ADN, en particular del ADNc, en el genoma de la célula vegetal. En efecto, el uso de la expresión transitoria en una célula vegetal o en una planta según la invención, permite aumentar los rendimientos de producción de las proteasas C1A en forma activa incluso a niveles altos, compatibles con un aprovechamiento comercial, pero incompatibles con la supervivencia de una planta que exprese estas proteasas tóxicas de manera estable. Esta toxicidad para el hospedador de expresión se ilustra en particular por la imposibilidad de producir la proteasa Der p1 en forma activa en levaduras de *P. pastoris* o en bacterias de *E. coli*. En el caso de una expresión transitoria, la recolección de la biomasa vegetal se produce durante el pico de expresión de la proteína recombinante, es decir, normalmente 4 a 6 días después de la transfección.

Preferentemente, la célula vegetal según la invención comprende un vector de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S.

En una realización preferida, la peptidasa C1A se selecciona entre peptidasas C1A de ácaros y peptidasas C1A vegetales. Preferentemente, la peptidasa C1A de origen vegetal es una peptidasa C1A de la familia de las Asteráceas (*Asteraceae*) o de la familia de las Fabáceas (*Fabaceae*).

Los genes que codifican las peptidasas C1A son muy conocidos. De esta manera, muchos de estos genes se han clonado y caracterizado (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=C1>). Como ejemplo, entre las aproximadamente 800 proteasas codificadas por genomas de plantas, más de 140 corresponden a cisteín proteasas (CisProt) que pueden agruparse en 15 familias y 5 clanes (Rawlings et al., 2010, Nucleic acids Res, 38, D227-233), incluidas las papaín proteasas C1A (clan CA, familia C1, subfamilia C1A), incluso subdividirse en proteínas de tipo catepsina L, B, H o F dependiendo de sus estructuras genéticas y relaciones filogenéticas (Martínez y Díaz, 2008, BMC Evol Biol, 8, 198-209).

Más preferentemente, la peptidasa C1A se selecciona entre Der p1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*), Der f1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Dermatophagoides farinae*), Eur m1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Euroglyphus maynei*), PEPC1 (cisteín peptidasa - CisP de *Aster tripolium*), SH-EP (sulfidril-vignain-endopeptidasa de *Vigna mungo*), AMB (peptidasas C1A de *Ambrosia artemisiifolia*, de *Ambrosia psilostachya* y de *Ambrosia trifida*) y entre las proteínas que presentan al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, preferentemente al menos 99 % de identidad con una de estas últimas. Más preferentemente, la peptidasa C1A se selecciona entre Der p1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*), Der f1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Dermatophagoides farinae*), Eur m1 (peptidasas C1A del grupo 1 de *Euroglyphus maynei*), PEPC1 (cisteín peptidasa - CisP de *Aster tripolium*), SH-EP (sulfidril-vignain-endopeptidasa de *Vigna mungo*), AMB (peptidasas C1A de *Ambrosia*

artemisiifolia, de *Ambrosia psilostachya* y de *ambrosia trifida*) y preferentemente AMB A11 (que corresponde a la secuencia de ácido nucleico KF528831 del GenBank, que tiene 1 161 pares de bases, o a la secuencia de la proteína AHA56102.1 del GenBank, que tiene 386 aminoácidos), la secuencia SEQ ID NO: 10, la secuencia SEQ ID NO: 11, la secuencia SEQ ID NO: 12 y proteínas que presentan al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, preferentemente al menos 99 % de identidad con una de estas últimas.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos en el sentido de la presente invención, se entiende designar un porcentaje de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después del mejor alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente en toda su longitud. Por "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo", se entiende el alineamiento para el cual el porcentaje de identidad determinado como el siguiente es el más alto. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realizan tradicionalmente comparando estas secuencias después de alinearlas de manera óptima, realizándose dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para la establecer la comparación puede realizarse, además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981, J. Mol Evol., 18: 38-46), mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988, PNAS, 85: 2444-2448), mediante programas informáticos utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA y TFASTA del paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

La molécula de ADN comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de la peptidasa C1A. Preferentemente, las preproteínas que presentan al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, preferentemente al menos 99 % de identidad con preproteínas silvestres, son también de interés. Preferentemente, la preproteína se selecciona entre la secuencia SEQ ID NO: 14, la secuencia SEQ ID NO: 15 y la secuencia SEQ ID NO: 16.

La preproteína de la peptidasa C1A comprende un péptido señal, un propéptido y la proteína C1A madura. Por tanto, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la preproteína según la invención comprende una secuencia que codifica el péptido señal, una secuencia que codifica el propéptido y una secuencia que codifica la proteína C1A madura.

El péptido señal es, en particular, cualquier péptido señal reconocido por la célula vegetal, provenga o no de una peptidasa C1A. Dicho péptido se dirige, en particular, a la peptidasa C1A en el medio intercelular. Preferentemente, el péptido señal es el de la quitinasa de tabaco, o el péptido señal natural de la peptidasa.

En cuanto al propéptido este se obtiene de una peptidasa C1A. El propéptido contiene el motivo GxNxFxD que parece ser esencial para una escisión adecuada de la forma precursora de la proteasa. La firma no contigua ERFNIN (Ex3Rx3Fx3Nx3I/Vx3N) es específica de las catepsinas de tipo L y H, mientras que en la catepsina de tipo F se observa una firma ERFNAQ. La función de esta firma se desconoce (Grudkowska y Zagdanska 2004, Acta Biochim Pol, 51: 609-624 Martínez y Díaz, 2008, BMC Evol Biol, 8, 198-209). Por el contrario, las proteasas catepsina de tipo B no llevan esta firma (Wiederanders 2003, Current Protein and Peptide Science, 4, 309-326; Martínez Díaz y 2008, BMC Evol Biol, 8, 198-209). Además, algunas catepsinas L también pueden contener una extensión C-terminal, que incluye una región rica en Pro y un dominio de granulina que presenta una fuerte homología con las proteasas de la familia epitelina/grulina de animales (Yamada et al., 2001, Plant Physiol, 127: 1626-1634).

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos heteróloga según la invención comprende, como propéptido, un propéptido de peptidasas C1A, en particular de ácaros o de origen vegetal. Preferentemente, el propéptido de la preproteína de la peptidasa C1A es el propéptido natural o el propéptido mutado o no de Der p1. Preferentemente, el propéptido de la preproteína de la peptidasa C1A se selecciona entre el propéptido natural de la peptidasa C1A, el propéptido natural de SH-EP (secuencia SEQ ID NO: 13), la secuencia SEQ ID NO: 8 (es decir, los aminoácidos 19 a 98 de la secuencia Uniprot p08176), la secuencia SEQ ID NO: 9 (es decir, la SEQ ID NO: 8 modificada por la sustitución de la glutamina en la posición 80 por una lisina) y la secuencia SEQ ID NO: 8 o 9 mutada en la asparagina 16.

Preferentemente, la secuencia de la proteína C1A madura se selecciona entre las secuencias maduras de Der p1, las secuencias maduras de Der f1, las secuencias maduras de Eur m1, la secuencia madura de PEPC1, la secuencia madura de SH-EP, la secuencia SEQ ID NO: 10, la secuencia SEQ ID NO: 11, la secuencia SEQ ID NO: 12 y proteínas que presentan al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, preferentemente al menos 99 % de identidad con una de estas últimas.

Según la invención, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la preproteína puede obtenerse a partir de un gen clonado conocido que codifica una peptidasa C1A, o bien seleccionando un banco de ADNc con anticuerpos anti-proteasa. Los métodos utilizados son muy conocidos por el experto en la materia, e incluyen, en particular, la identificación del gen por hibridación con sondas, PCR, secuenciación y clonación molecular. También

es posible sintetizar el gen para reflejar el uso de codones preferidos en plantas; en este caso, se habla de optimización de codones, a menudo útil para una fuerte expresión de las proteasas seleccionadas (Murray et al, Nucleic Acid Res. 17, 477.498 (1980).

- 5 En una realización preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la preproteína está unida a una secuencia (denominada secuencia de direccionamiento) que la permite dirigirse a un compartimiento de almacenamiento de la peptidasa C1A, para controlar su maduración. Esta maduración es necesaria para obtener proteasas en forma activa. Comprende, en particular, la escisión proteolítica del propéptido N-terminal; este último tiene lugar cuando la preproteína de la peptidasa C1A se expresa en plantas. Al contrario, no se efectúa en sistemas de producción de bacterias o levaduras. En una realización preferida de la presente invención, la peptidasa C1A se produce fusionada con su propio propéptido o con el propéptido de la peptidasa C1A o con un propéptido de peptidasa C1A vegetal, para aumentar los rendimientos de producción de la proteína.

- 15 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la preproteína según la invención comprende además una secuencia peptídica de direccionamiento intracelular. Preferentemente, esta secuencia peptídica de direccionamiento dirige la peptidasa C1A, en forma soluble o de membrana, hacia el retículo endoplasmático o a los diversos compartimentos que constituyen el sistema endomembranoso de secreción de la célula vegetal.

- 20 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la preproteína según la invención se muta para controlar la maduración de la proteasa. En este caso, puede mutarse para bloquear la escisión proteolítica, por ejemplo, utilizando una versión modificada del propéptido de Der p1, del propéptido-Lys, donde el último aminoácido se muta a Lys; o bien mutarse para controlar la cinética de escisión de este propéptido utilizando el propéptido-Gly, derivado del propéptido de Der p1 pero después de la mutación de la asparagina del sitio de glucosilación a glutamina. Preferentemente, el propéptido puede, por tanto, seleccionarse entre el propéptido de Der p1 donde el último aminoácido se muta a lisina, y el propéptido de Der p1 donde la asparagina del sitio de glucosilación muta a glutamina. El propéptido también puede seleccionarse entre los propéptidos de peptidasas C1A de origen vegetal.

- 30 Una vez que el gen de interés se ha aislado y modificado para contener la totalidad o parte de las modificaciones descritas anteriormente y obtener la secuencia de nucleótidos heteróloga, esta última se coloca en un vector de expresión por métodos convencionales. La selección de un vector de expresión apropiado dependerá del método de introducción del vector de expresión en las células hospedadoras. Un vector de expresión típico contiene elementos de ADN procariota que codifica un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico que debe proporcionarse para el crecimiento y la selección del vector de expresión en el hospedador bacteriano, un sitio de clonación para la inserción de una secuencia de ADN exógeno que codifica la proteasa; elementos de ADN eucariota, como una secuencia de inicio de la transcripción del gen exógeno, como un promotor, y elementos de ADN que controlan el tratamiento de transcritos, como secuencias de terminación/poliadenilación y un casete de expresión que permite la expresión de un supresor de silenciamiento. También contiene secuencias tales como ADN-t que son necesarias para la integración de un fragmento de ADN en la planta o en la célula vegetal.

- 40 Preferentemente, el vector de expresión comprende:

- elementos de ADN procariota que codifica un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
- al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S;
- un casete de expresión que permite la expresión de un supresor de silenciamiento, preferentemente p19; y
- elementos de ADN que controlan el tratamiento de transcritos, como secuencias de terminación/poliadenilación, preferentemente la secuencia Tnos (secuencia de terminación de la nopalina sintasa).

- 50 Preferentemente, el vector de expresión es pAG01.

- Los promotores utilizados para controlar la expresión de proteasas son promotores fuertes, y pueden ser promotores de genes de plantas, tales como, por ejemplo, el promotor de la ubiquitina, el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, promotores de *Agrobacterium tumefaciens*, los promotores de la nopalina sintasa y de la octopina sintasa, o incluso promotores de virus, como el 19S y el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Preferentemente, el promotor fuerte es 35S.

- La alta expresión y calidad de las peptidasas recombinantes producidas en la invención permiten diseñar una producción comercial de proteasas C1A. En efecto, normalmente la peptidasa C1A se expresa en una cantidad igual a al menos el 0,1 % de las proteínas solubles totales de la planta, pero a menudo en una cantidad mucho mayor, pudiendo alcanzar una cantidad de 5 a 10 %.

- La planta que comprende las células vegetales según la invención puede ser una planta completa, pero también puede ser una parte de la planta, tal como las hojas.

- La planta o las células vegetales según la invención pueden utilizarse tal cual como un medicamento. Como ejemplo,

cuando la proteasa C1A se utiliza como una enzima digestiva, puede ser particularmente ventajoso alimentar directamente al animal con la planta que expresa esta proteasa. En otras aplicaciones, la proteasa recombinante se purifica después de la extracción de la planta o de las células vegetales que la expresan. Para facilitar su purificación, la proteasa podrá expresarse fusionada con etiquetas (His6, GST, MBP, FLAA etc.) que se localizarán preferentemente en la posición N o C-terminal de la proteína madura.

La peptidasa C1A que puede obtenerse mediante el procedimiento según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención, puede utilizarse como un medicamento. También puede utilizarse en el diagnóstico de alergias, en particular, alergias a ácaros o alergias a determinadas plantas. Por tanto, un objeto de la invención es un kit para diagnosticar alergias, que comprende la peptidasa según la invención, y medios para medir los anticuerpos dirigidos contra esta peptidasa.

Métodos generales de cultivo de plantas, así como procedimientos para introducir vectores de expresión en un tejido vegetal, están a disposición del experto en la materia y varían dependiendo de la planta seleccionada. Preferentemente, las plantas se cultivarán según las técnicas no contaminantes de la plataforma Allergopur. Este procedimiento para producir proteínas recombinantes se describe en la solicitud FR1255510, y comprende una primera etapa de cultivo de la planta, en aeroponía o hidroponía, preferentemente cultivo de flotación libre, y con iluminación LED. Después de esta primera etapa, en particular, cinco semanas en cultivo hidropónico sobre flotadores libres, la agroinfiltración de las plantas se realiza al vacío, mediante agrobacterias que comprenden un fragmento de ADN que codifica la proteasa C1A recombinante. Esta etapa de agroinfiltración puede implementarse por cualquier medio que permita hacer el vacío. Preferentemente, en el procedimiento utilizado según la invención, se realiza al vacío por efecto Venturi. Entre las agrobacterias que pueden utilizarse según la invención, pueden mencionarse, preferentemente, las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 o C58. Una vez realizada la etapa de agroinfiltración, normalmente las plantas se ponen a escurrir boca abajo durante 15 minutos, y después vuelven a cultivarse, normalmente durante 4 a 6 días, idealmente garantizando una nebulización frecuente de estas últimas durante las 6 primeras horas de cultivo después de la agroinfiltración. Finalmente, la proteína se extrae y se purifica.

De esta manera, preferentemente, el objeto de la invención es también un procedimiento para producir una peptidasa C1A en una célula vegetal o en una planta, que comprende las siguientes etapas:

- a) transformación de agrobacterias con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte; y
- b) transfección de la célula vegetal o de la planta con las agrobacterias obtenidas en la etapa a).

Preferentemente, las agrobacterias que pueden utilizarse en la etapa a) se seleccionan entre las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 y C58. Preferentemente, el vector de expresión utilizado en la etapa a) comprende:

- elementos de ADN procariota que codifica un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
- al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S;
- un casete de expresión que permite la expresión de un supresor de silenciamiento, preferentemente p19; y
- elementos de ADN que controlan el tratamiento de transcritos, como secuencias de terminación/poliadenilación, preferentemente la secuencia Tnos.

La transformación de la etapa a) se realiza normalmente por métodos conocidos de la técnica anterior, por ejemplo, mediante choques térmicos con pases sucesivos a 4 °C, -80 °C y 37 °C.

La transfección de la etapa b) comprende, preferentemente, las siguientes etapas:

- b1) cultivar la célula vegetal o la planta, en aeroponía o hidroponía, y con luz LED (por sus siglas en inglés, *Light Emitting Diode*, que en español significa Diodo Emisor de Luz), preferentemente durante cinco semanas en hidroponía sobre flotadores libres,
- b2) agroinfiltrar al vacío la célula vegetal o la planta obtenida en b1), por las agrobacterias obtenidas en la etapa a). Preferentemente, esta etapa de agroinfiltración se realiza al vacío por efecto Venturi.
- b3) volver a cultivar la célula vegetal o la planta obtenida en b2), normalmente durante 4 a 6 días.

Finalmente, preferentemente, la peptidasa C1A producida de esta manera se extrae y se purifica.

Descripción de las figuras

Los siguientes ejemplos, ilustran, pero no pretenden limitar el alcance de la invención. Será obvio para el experto en la materia que es posible realizar variaciones y modificaciones y que están dentro del alcance y espíritu de la invención.

Las leyendas de las figuras son las siguientes:

Figura 1: Representación esquemática de los diferentes casetes que permiten producir una peptidasa C1A madura y activa utilizando o el péptido señal y el propéptido natural de la proteína (A), o el péptido señal de la quitinasa de tabaco y el propéptido de Der p1 (denominado también DP1) (P08176) (SEQ ID NO: 8) para aumentar los rendimientos (B), o el péptido señal de la quitinasa de tabaco y el propéptido Der p1 modificado por inserción de una lisina en posición C-terminal del propéptido (SEQ ID NO: 9) para controlar la escisión del propéptido (C) o de nuevo el péptido señal de quitinasa de tabaco y el propéptido Der p1 mutado en el sitio de N-glucosilación para controlar la cinética de escisión del propéptido (D).

A (SEQ ID NO: 1-4): ADNc que codifica la forma natural de la proteína. Este ADNc podrá fusionarse con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,

B (SEQ ID NO: 5): ADNc que codifica la forma madura de una peptidasa C1A fusionada a la secuencia señal de la quitinasa de tabaco (Neuhaus, J.-M. (1996) y al propéptido Der p1 (p08176 - aa 19 a 98 o SEQ ID NO: 8). Este ADNc podrá fusionarse con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,

C (SEQ ID NO: 6): ADNc que codifica la forma madura de una peptidasa C1A fusionada a la secuencia señal de la quitinasa de tabaco (Neuhaus, J.-M. (1996)) y al propéptido Der p1 (p08176 - 19 a 98 o SEQ ID NO: 8) donde el aminoácido 98 de la secuencia p08176 (= aminoácido 80 de la SEQ ID NO: 8) está sustituido por una Lys (SEQ ID NO: 9). Este ADNc podrá fusionarse con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,

D (SEQ ID NO: 7): ADNc que codifica la forma madura de una peptidasa C1A fusionada a la secuencia señal de la quitinasa de tabaco (Neuhaus, J.-M. (1996) y al propéptido Der p1 (p08176 - AA 19 a 98 o SEC ID NO: 8) donde la asparagina 34 del sitio de glucosilación de la secuencia p08176 (= aminoácido 16 de la SEQ ID NO: 8 o 9) está mutado a glutamina. Este ADNc podrá fusionarse con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

Figura 2: Para la expresión y la producción de diferentes formas de peptidasas C1A se utilizó la plataforma AllergoPur.

Figura 3: Representación esquemática del ADNc que codifica la forma precursora de la peptidasa C1A de *Aster tripolium* (A), *Vigna mungo* (C) o de ácaros (D) o que codifica una forma precursora quimérica de la peptidasa C1A de las Asteráceas (*Asteraceae*) (B). Los genes se expresan bajo dependencia del promotor 35S, y aguas arriba de la secuencia de terminación de la transcripción de la nopalina sintasa. El plásmido comprende las secuencias necesarias para la incorporación en la planta utilizando *Agrobacterium*, que comprende los límites izquierdo y derecho del ADN-T, la región de origen de la replicación y el sitio de cointegración. Una etiqueta (TAG) estará o no integrada en la posición N o C-terminal de la proteína madura.

Figura 4: Las proteínas extraídas de plantas no transfectadas (carril 1 TS (tipo silvestre)) o transfectadas al vacío para la expresión de proteínas DPI (carril 2), SHEP (carril 3) o PEPC1 (carril 4), se analizaron mediante SDS-PAGE (panel A) e inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una etiqueta Flag (panel B). El análisis por inmunodetección reveló la producción específica de 3 proteasas de la familia C1A. Estas proteasas se expresan en la forma precursora (*) y en la forma madura (**).

Figura 5: Las proteínas extraídas de plantas no transfectadas (carril 1 TS (tipo silvestre)), transfectadas al vacío con la proteína DP1 (carril 2), SHEP (carril 3) o PEPC1 (carril 4), se analizaron mediante SDS-PAGE (panel A) e inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una etiqueta Flag (panel B). Las proteínas se extrajeron en condiciones nativas y después se incubaron a 4 °C durante 0 min, 120 min o toda la noche (T/N). El análisis de SDS-PAGE demuestra la proteólisis de varias proteínas endógenas de extractos de plantas que expresan una proteasa C1A mientras que estas proteínas son estables en los extractos de control (TS) (Panel A). La proteasa C1A contenida en estos extractos es estable en las mismas condiciones (panel B).

Figura 6: Las proteínas extraídas de plantas no transfectadas (carril 1 TS (tipo silvestre)), transfectadas al vacío con la proteína DP1 (carril 2), SHEP (carril 3) o PEPC1 (carril 4), se analizaron mediante SDS-PAGE (panel A) e inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una etiqueta Flag (panel B). Las proteínas se extrajeron en condiciones de desnaturalización en presencia de un agente reductor y después se incubaron a 4 °C durante 0 min, 120 min o toda la noche (T/N). En estas condiciones, el análisis de SDS-PAGE revela una fuerte degradación de las proteínas endógenas de los extractos de plantas que expresan una proteasa C1A, mientras que estas proteínas son estables en los extractos de control (TS). Esta degradación es casi completa para los extractos incubados durante la noche (Panel A). En las mismas condiciones, ciertas proteasas C1A también se degradan con el tiempo, como lo ilustra el análisis por inmunodetección (panel B).

Figura 7: Las proteínas extraídas de plantas no transfectadas (carril 1 TS) o transfectadas al vacío con la proteína DP1 (carril 2), o por la proteína Derp1L (DP1L), cuyo propéptido se mutó mediante la sustitución de Gln 98 de la secuencia p08176 por una lisina (propéptido de secuencia SEQ ID NO: 9) (carril 3), se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una etiqueta Flag. El análisis de inmunodetección muestra la producción de la forma precursora y la forma madura para las plantas que expresan

la proteína DP1, mientras que en las plantas que expresan DP1L solo se produce la forma precursora inactiva.

Figura 8: Las proteínas extraídas de plantas transfectadas al vacío con la proteína DP1, se purificaron en una columna GE Healthcare HisTrap Excell y después las fracciones totales (FT), no retenidas en la columna (FNR) o retenidas en la columna (FR), se analizaron por electroforesis SDS_PAGE. Como se ilustra en el carril FR, la proteasa DP1 está purificada en un 85 %, después de esta etapa se realiza una etapa de filtración en gel para mejorar la purificación.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo:

Diseño molecular y síntesis de genes

Los ADNc se sintetizan optimizando el uso de codones para su reconocimiento por el sistema vegetal. En el contexto de esta invención, la optimización preferida es la optimización para una expresión en *Nicotiana benthamiana*, como se muestra en la Figura 1.

Preparación de plásmidos

Los sitios de restricción Xba I / kpn I y Sal I / Sac I están integrados respectivamente en los extremos 5' y 3' del ADNc durante la síntesis. Estos sitios se utilizan para clonar los ADNc en el vector de expresión binario pAG01 (Figura 1). Los ADNc se clonan aguas arriba de un promotor 35S (35S) y aguas abajo de una secuencia de terminación de la nopalina sintasa (Tnos); el vector pAG01 también contiene un casete de expresión que permite expresar el supresor de silenciamiento p19 simultáneamente con la proteína recombinante para aumentar los rendimientos de producción. Los vectores se utilizan después para transformar la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Expresión transitoria de peptidasas C1A en hojas de *Nicotiana benthamiana* - Utilización de la plataforma AllergoPur

Para la producción mediante expresión transitoria, se utiliza *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para la transferencia de un ADNc que codifica la proteasa sin que el gen de interés se integre en el genoma de la célula vegetal: en este caso se habla de transfección y no de transgénesis. Las plantas se cultivan en condiciones hidropónicas en presencia de un medio nutritivo (GHE, floragrow, floramicro, florabloom, 10 ml/15 ml/5 ml por 10 l de AGUA de ósmosis) y con iluminación LED. La agrobacteria se transfiere al tejido foliar mediante agroinfiltración según dos procedimientos. Para la producción de pequeños lotes de proteasas destinadas a la selección de prototipos, las agrobacterias se inyectan manualmente con una jeringa aplicada contra la epidermis de la cara inferior de la hoja. Para el análisis de los diferentes prototipos de proteasas, se utilizan discos foliares tomados de las hojas 4 a 6 días después de la agroinfiltración. Esta etapa de selección permite definir el vector de expresión que se utilizará para obtener una proteasa de calidad óptima. Para la producción comercial a gran escala, se utiliza el mismo procedimiento, pero en este caso, la agroinfiltración se realiza al vacío, en recintos que contienen varios litros de un cultivo de agrobacterias y donde se infiltran simultáneamente docenas de plantas. Después, estas plantas vuelven a cultivarse durante 4 a 6 días antes de la purificación de la proteasa C1A de los extractos foliares (Figura 2).

Expresión de 4 peptidasas de la familia C1

La expresión de proteínas, así como los rendimientos, se analizan mediante transferencia de Western y ELISA, respectivamente. Se ilustran los resultados de 3 peptidasas C1A de plantas (SH-EP-P12412 y PEPC1-Q75QV8) o de ácaro (DP1-p08176) (Figuras 3 y 4).

Las proteasas expresadas son activas. En efecto, las proteínas vegetales extraídas de las hojas que expresan las proteasas C1A se degradan rápidamente después de la extracción, mientras que en extractos de plantas no transfectadas se mantienen estables (Figura 5). Asimismo, esta degradación de las proteínas endógenas es muy rápida y descontrolada cuando la extracción se realiza en presencia de agentes reductores (Figura 6). Este aumento de la actividad de las peptidasas C1A en presencia de agentes reductores es una característica de estas proteasas (Beers et al, 2000, Plant Mol Biol, 44: 399-415).

Producción de una proteasa C1A en forma de un precursor inactivo

La fusión del ADNc que codifica la proteína madura de DP1 con la secuencia señal de la quitinasa y el propéptido de la secuencia SEQ ID NO: 9 (modificada por la sustitución de glutamina 80/lisina en la posición C-terminal del propéptido) (secuencia total DP1L, SEQ ID NO: 6) permite, como se ilustra en la Figura 7, bloquear la escisión del propéptido y acumular una proteína inactiva en el extracto vegetal. Después, este propéptido puede escindirse *in vivo* cuando se coexpresa la proteína Lys-C o *in vitro* cuando se incuba con la misma proteína.

Purificación y caracterización

Como se ilustra en la Figura 8, las proteasas se extraen de la biomasa reciente o congelada y después se purifican en una columna HisTrap Excell.

5 Como se ilustra en el carril FR, la proteasa DPI se purifica en un 85 %, después de esta etapa se realiza una etapa de filtración en gel para mejorar la purificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> ANGANY GENETICS

<120> Producción comercial de peptidasas C1A mediante expresión transitoria en plantas

15 <130> BFF130140

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> Q75QV8

<400> 1

30

ES 2 736 035 T3

Met	Asn	Leu	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	1	5	10	15
Ala	Val	Thr	Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ile	Arg	Gln	Val	Val	Gln	20	25	30	
Asn	Asp	Glu	Thr	Glu	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	His	35	40	45	
His	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Phe	Gly	Arg	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	50	55	60	
Glu	Glu	His	Glu	Tyr	Arg	Leu	Thr	Val	Phe	Lys	Ser	Asn	Leu	Arg	Arg	65	70	75	80
Ala	Lys	Arg	His	Gln	Val	Leu	Asp	Pro	Thr	Ala	Lys	His	Gly	Val	Thr	85	90	95	
Lys	Phe	Ser	Asp	Leu	Thr	Pro	Ser	Glu	Phe	Arg	Lys	Lys	Tyr	Leu	Gly	100	105	110	
Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Pro	Ala	Asp	Ala	Asn	Lys	Ala	Pro	Ile	115	120	125	
Leu	Pro	Thr	Ser	Asn	Leu	Pro	Gln	Asp	Phe	Asp	Trp	Arg	Asp	Lys	Gly	130	135	140	
Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asn	Gln	Gly	Ser	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ser	145	150	155	160

ES 2 736 035 T3

Phe Ser Thr Thr Gly Ala Leu Glu Gly Ser His Phe Leu Gln Thr Gly
 165 170 175
 Glu Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp His Glu
 180 185 190
 Cys Asp Pro Ala Glu Tyr Asn Ser Cys Asp Ser Gly Cys Asn Gly Gly
 195 200 205
 Leu Met Asn Asn Ala Phe Glu Tyr Ile Leu Lys Ala Gly Gly Leu Gln
 210 215 220
 Lys Glu Ala Asp Tyr Pro Tyr Thr Gly Arg Asp Gly Thr Cys Lys Phe
 225 230 235 240
 Asp Lys Ser Lys Ile Ala Ala Ser Val Ala Asn Phe Ser Val Val Ser
 245 250 255
 Thr Asp Glu Asp Gln Ile Ala Ala Asn Leu Val Thr Asn Gly Pro Leu
 260 265 270
 Ala Ile Gly Ile Asn Ala Ala Trp Met Gln Thr Tyr Ile Gly Gln Val
 275 280 285
 Ser Cys Pro Tyr Ile Cys Ser Lys Thr Lys Met Asp His Gly Val Leu
 290 295 300
 Leu Val Gly Tyr Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Arg Phe Lys Glu
 305 310 315 320
 Lys Pro Tyr Trp Ile Ile Lys Asn Ser Trp Gly Glu Asp Trp Gly Glu
 325 330 335
 Asp Gly Tyr Tyr Lys Leu Cys Ser Gly Tyr Asn Ala Cys Gly Met Asp
 340 345 350
 Thr Met Val Ser Ala Val Val Ser Thr Asn Thr
 355 360

<210> 2
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Q75QV8+GR935688.1

<400> 2

ES 2 736 035 T3

Met Asn Leu Leu Ser Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ser

ES 2 736 035 T3

1	5	10	15
Ala Val Thr	Ala Asp Ser Ser Asp	Pro Leu Ile Arg Gln	Val Val Gln
	20	25	30
Asn Asp Glu Thr Glu Ile Glu Ser Asp Pro Leu Leu Asp Pro Glu His			
	35	40	45
His Phe Lys Leu Phe Lys Asn Lys Phe Gly Arg Thr Tyr Asp Thr Glu			
	50	55	60
Glu Glu His Glu Tyr Arg Leu Thr Val Phe Lys Ser Asn Leu Arg Arg			
	65	70	75
Ala Lys Arg His Gln Val Leu Asp Pro Thr Ala Lys His Gly Val Thr			
	85	90	95
Lys Phe Ser Asp Leu Thr Pro Ser Glu Phe Arg Lys Lys Tyr Leu Gly			
	100	105	110
Leu Lys Ser Lys Leu Lys Leu Pro Ala Asp Ala Asn Lys Ala Pro Ile			
	115	120	125
Leu Pro Thr Ser Asn Leu Pro Gln Asp Phe Asp Trp Arg Asp Lys Gly			
	130	135	140
Ala Val Thr Pro Val Lys Asn Gln Gly Ser Cys Gly Ser Cys Trp Ser			
	145	150	155
Phe Ser Thr Thr Gly Ala Leu Glu Gly Ser His Phe Leu Gln Thr Gly			
	165	170	175
Glu Leu Val Ser Leu Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp His Glu			
	180	185	190
Cys Asp Pro Ala Glu Tyr Asn Ser Cys Asp Ser Gly Cys Asn Gly Gly			
	195	200	205
Leu Met Asn Asn Ala Phe Glu Tyr Ile Leu Lys Ala Gly Gly Val Gln			
	210	215	220
Lys Glu Ser Asp Tyr Pro Tyr Thr Gly Lys Asp Gly Thr Cys His Phe			
	225	230	235
Asp Lys Thr Lys Ile Ala Ala Ser Val Ser Asn Phe Ser Val Ile Gly			
	245	250	255

ES 2 736 035 T3

Thr Asp Glu Asp Gln Ile Ala Ala Asn Leu Val Lys Asn Gly Pro Leu
260 265 270

Ala Ile Gly Ile Asn Ala Ala Trp Met Gln Thr Tyr Ile Gly Lys Val
275 280 285

Ser Cys Pro Tyr Ile Cys Ser Lys Lys Arg Leu Asp His Gly Val Leu
290 295 300

Leu Val Gly Tyr Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Pro Ser Arg Leu Lys Glu
305 310 315 320

Lys Pro Tyr Trp Ile Ile Lys Asn Ser Trp Gly Pro Asp Trp Gly Glu
325 330 335

Asp Gly Tyr Tyr Lys Ile Cys Ser Gly Tyr Asn Leu Cys Gly Met Asp
340 345 350

Thr Met Val Ser Ala Val Val Ser Thr Asn Thr
355 360

<210> 3
<211> 362
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> P12412

<400> 3

ES 2 736 035 T3

Met Ala Met Lys Lys Leu Leu Trp Val Val Leu Ser Leu Ser Leu Val
1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Asn Ser Phe Asp Phe His Glu Lys Asp Leu Glu Ser
20 25 30

Glu Glu Ser Leu Trp Asp Leu Tyr Glu Arg Trp Arg Ser His His Thr
35 40 45

Val Ser Arg Ser Leu Gly Glu Lys His Lys Arg Phe Asn Val Phe Lys
50 55 60

Ala Asn Val Met His Val His Asn Thr Asn Lys Met Asp Lys Pro Tyr
65 70 75 80

Lys Leu Lys Leu Asn Lys Phe Ala Asp Met Thr Asn His Glu Phe Arg
85 90 95

Ser Thr Tyr Ala Gly Ser Lys Val Asn His His Lys Met Phe Arg Gly

ES 2 736 035 T3

100				105				110							
Ser	Gln	His	Gly	Ser	Gly	Thr	Phe	Met	Tyr	Glu	Lys	Val	Gly	Ser	Val
		115					120					125			
Pro	Ala	Ser	Val	Asp	Trp	Arg	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Asp	Val	Lys
	130					135					140				
Asp	Gln	Gly	Gln	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Thr	Ile	Val	Ala
145					150					155					160
Val	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	Ile	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Lys	Glu	Glu	Asn	Gln	Gly	Cys	Asn
			180					185					190		
Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Ser	Ala	Phe	Glu	Phe	Ile	Lys	Gln	Lys	Gly	Gly
		195					200					205			
Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ala	Gln	Glu	Gly	Thr	Cys
	210					215					220				
Asp	Glu	Ser	Lys	Val	Asn	Asp	Leu	Ala	Val	Ser	Ile	Asp	Gly	His	Glu
225					230					235					240
Asn	Val	Pro	Val	Asn	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Ala	Asn
				245					250					255	
Gln	Pro	Val	Ser	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly	Ser	Asp	Phe	Gln	Phe
			260					265					270		
Tyr	Ser	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Asp	Cys	Asn	Thr	Asp	Leu	Asn	His
		275					280					285			
Gly	Val	Ala	Ile	Val	Gly	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Tyr
	290					295					300				
Trp	Ile	Val	Arg	Asn	Ser	Trp	Gly	Pro	Glu	Trp	Gly	Glu	Gln	Gly	Tyr
305				310						315					320
Ile	Arg	Met	Gln	Arg	Asn	Ile	Ser	Lys	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile
				325					330					335	
Ala	Met	Met	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro	Thr
			340					345					350		

ES 2 736 035 T3

Gly Ser Leu Ser Ser Pro Lys Asp Glu Leu
355 360

5 <210> 4
<211> 320
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> P08176
<400> 4

ES 2 736 035 T3

Met	Lys	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	1	5	10	15
Tyr	Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Ile	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Ala	20	25	30	
Phe	Asn	Lys	Ser	Tyr	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	35	40	45	
Asn	Phe	Leu	Glu	Ser	Val	Lys	Tyr	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Gly	Ala	Ile	50	55	60	
Asn	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	65	70	75	80
Met	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Gln	Phe	Asp	Leu	Asn	85	90	95	
Ala	Glu	Thr	Asn	Ala	Cys	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	100	105	110	
Asp	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	115	120	125	
Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	130	135	140	
Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	145	150	155	160
Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	165	170	175	
Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	180	185	190	
Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ala	Gln	Arg				

ES 2 736 035 T3

195					200					205					
Phe	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Val	Asn	Lys
210						215					220				
Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ser	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile
225					230					235					240
Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Arg	His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile
				245					250					255	
Ile	Gln	Arg	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ala	Val	Asn	Ile
			260					265					270		
Val	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Val	Arg	Asn
	275						280					285			
Ser	Trp	Asp	Thr	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Ala	Ala
290						295					300				
Asn	Ile	Asp	Leu	Met	Met	Ile	Glu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Val	Val	Ile	Leu
305					310					315					320

<210> 5

<211> 334

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> ADNc que codifica la forma madura de una peptidasa C1A fusionada a la secuencia señal de la quitinasa de tabaco

<400> 5

ES 2 736 035 T3

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

Tyr Ala Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala
20 25 30

Phe Asn Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys
35 40 45

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile
50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu
65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn

ES 2 736 035 T3

85										90					95				
Ala	Glu	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Val	Asp	Trp	Arg	Lys	Lys	Gly	Ala	Val				
			100					105					110						
Thr	Asp	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Gln	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser				
		115					120					125							
Thr	Ile	Val	Ala	Val	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	Ile	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu				
	130					135					140								
Val	Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Lys	Glu	Glu	Asn				
145					150					155					160				
Gln	Gly	Cys	Asn	Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Ser	Ala	Phe	Glu	Phe	Ile	Lys				
				165					170					175					
Gln	Lys	Gly	Gly	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Ala	Gln				
			180					185					190						
Glu	Gly	Thr	Cys	Asp	Glu	Ser	Lys	Val	Asn	Asp	Leu	Ala	Val	Ser	Ile				
		195					200					205							
Asp	Gly	His	Glu	Asn	Val	Pro	Val	Asn	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys				
	210					215					220								
Ala	Val	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Ser	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly	Ser				
225					230					235					240				
Asp	Phe	Gln	Phe	Tyr	Ser	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Asp	Cys	Asn	Thr				
				245					250					255					
Asp	Leu	Asn	His	Gly	Val	Ala	Ile	Val	Gly	Tyr	Gly	Thr	Thr	Val	Asp				
			260					265					270						
Gly	Thr	Asn	Tyr	Trp	Ile	Val	Arg	Asn	Ser	Trp	Gly	Pro	Glu	Trp	Gly				
		275					280					285							
Glu	Gln	Gly	Tyr	Ile	Arg	Met	Gln	Arg	Asn	Ile	Ser	Lys	Lys	Glu	Gly				
	290					295					300								
Leu	Cys	Gly	Ile	Ala	Met	Met	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser				
305					310					315					320				
Asp	Asn	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	Asp	Glu	Leu						
				325					330										

<210> 6
<211> 320

<212> PRT
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> mutante

<400> 6

ES 2 736 035 T3

Met	Lys	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	1	5	10	15
Tyr	Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Ile	Lys	Thr	Phe	Glu	Glu	Tyr	Lys	Lys	Ala	20	25	30	
Phe	Asn	Lys	Ser	Tyr	Ala	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	35	40	45	
Asn	Phe	Leu	Glu	Ser	Val	Lys	Tyr	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Gly	Ala	Ile	50	55	60	
Asn	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	65	70	75	80
Met	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Gln	Phe	Asp	Leu	Asn	85	90	95	
Ala	Lys	Thr	Asn	Ala	Cys	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	100	105	110	
Asp	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	115	120	125	
Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	130	135	140	
Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	145	150	155	160
Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	165	170	175	
Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	180	185	190	
Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ala	Gln	Arg	195	200	205	
Phe	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Val	Asn	Lys				

ES 2 736 035 T3

210	215	220
Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile 225 230 235 240		
Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile 245 250 255		
Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile 260 265 270		
Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn 275 280 285		
Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala 290 295 300		
Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu 305 310 315 320		

<210> 7
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> mutante
 <400> 7

ES 2 736 035 T3

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

Tyr Ala Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala
20 25 30

Phe Gln Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys
35 40 45

Asn Phe Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile
50 55 60

Asn His Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu
65 70 75 80

Met Ser Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn
85 90 95

Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile
100 105 110

ES 2 736 035 T3

Asp	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly			
		115					120					125						
Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala			
	130					135					140							
Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu			
145					150					155					160			
Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg			
				165					170					175				
Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr			
			180					185					190					
Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ala	Gln	Arg			
		195					200					205						
Phe	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Val	Asn	Lys			
	210					215					220							
Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ser	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile			
225					230					235					240			
Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Asp	Ala	Phe	Arg	His	Tyr	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile			
				245					250					255				
Ile	Gln	Arg	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ala	Val	Asn	Ile			
			260					265					270					
Val	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Ile	Val	Arg	Asn			
		275					280					285						
Ser	Trp	Asp	Thr	Asn	Trp	Gly	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Ala	Ala			
	290					295					300							
Asn	Ile	Asp	Leu	Met	Met	Ile	Glu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Val	Val	Ile	Leu			
305					310					315					320			

<210> 8
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> propéptido Der p1

<400> 8

ES 2 736 035 T3

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu
65 70 75 80

<210> 9
<211> 80
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> propéptido modificado

<400> 9

Arg Pro Ser Ser Ile Lys Thr Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Ala Phe Asn
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ala Thr Phe Glu Asp Glu Glu Ala Ala Arg Lys Asn Phe
20 25 30

Leu Glu Ser Val Lys Tyr Val Gln Ser Asn Gly Gly Ala Ile Asn His
35 40 45

Leu Ser Asp Leu Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Phe Leu Met Ser
50 55 60

Ala Glu Ala Phe Glu His Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Lys
65 70 75 80

<210> 10
<211> 254
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> AMB A11 modificado en C-terminal

<400> 10

ES 2 736 035 T3

Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Asp	Phe	Ile
1				5					10					15	

ES 2 736 035 T3

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

<210> 11
 <211> 278

<212> PRT
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> proteína de fusión

<400> 11

ES 2 736 035 T3

Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Asp	Phe	Ile	1	5	10	15
Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Lys	Ile	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	20	25	30	
Asn	Ala	Val	Thr	Asp	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gly	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	35	40	45	
Ala	Phe	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Asn	Ala	Ile	Arg	Thr	50	55	60	
Gly	Lys	Leu	Val	Lys	Phe	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Met	65	70	75	80
Thr	Asn	Ala	Gly	Cys	Asp	Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Pro	Ala	Phe	Thr	Tyr	85	90	95	
Val	Ile	Lys	His	Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Glu	Ala	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Val	100	105	110	
Gly	Lys	Arg	Glu	Thr	Cys	Asp	Lys	Ala	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Lys	115	120	125	
Ile	Asp	Gly	Arg	Gln	Asn	Val	Pro	Gly	Leu	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	130	135	140	
Lys	Ala	Val	Ala	His	Gln	Pro	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Leu	Ser	Gly	145	150	155	160
His	Gly	Leu	Gln	Phe	Tyr	Ser	Glu	Gly	Val	Tyr	Thr	Gly	Asp	Cys	Gly	165	170	175	
Thr	Glu	Pro	Asn	His	Gly	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Tyr	Gly	Glu	Asn	Glu	180	185	190	
Lys	Gly	Ile	Lys	Phe	Trp	Thr	Val	Lys	Asn	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Trp	195	200	205	
Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Ile	His	Leu	Gln	Arg	Gly	Ala	Arg	Lys	Glu	Gly	210	215	220	

ES 2 736 035 T3

Leu Cys Gly Val Ala Met His Ser Ser Phe Pro Ile Met Asn Asp Pro
225 230 235 240

Asn Pro Pro Lys Asp Asp Pro Asn Gly Pro Lys Asp Asp Pro Asp Ala
245 250 255

Pro Lys Asp Pro Lys Phe Lys Thr Thr Gln Arg Leu Gln Gly Ile Arg
260 265 270

Thr Lys Leu Leu Glu Leu
275

<210> 12
<211> 254
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión

<400> 12

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Asn Lys Asp Phe Ile
1 5 10 15

Tyr Ala Asn Val Thr Lys Ile Pro Asp Lys Val Asp Trp Arg Glu Lys
20 25 30

Asn Ala Val Thr Asp Val Lys Gly Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp
35 40 45

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

Gly Lys Leu Val Lys Phe Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp Met
65 70 75 80

Thr Asn Ala Gly Cys Asp Gly Gly Leu Met Glu Pro Ala Phe Thr Tyr
85 90 95

Val Ile Lys His Gly Gly Ile Ala Pro Glu Ala Ser Tyr Pro Tyr Val
100 105 110

Gly Lys Arg Glu Thr Cys Asp Lys Ala Lys Ile Lys Asp Val Leu Lys
115 120 125

Ile Asp Gly Arg Gln Asn Val Pro Gly Leu Asp Glu Glu Ala Leu Arg
130 135 140

ES 2 736 035 T3

Lys Ala Val Ala His Gln Pro Val Ala Thr Gly Ile Gln Leu Ser Gly
145 150 155 160

His Gly Leu Gln Phe Tyr Ser Glu Gly Val Tyr Thr Gly Asp Cys Gly
165 170 175

Thr Glu Pro Asn His Gly Val Gly Ile Val Gly Tyr Gly Glu Asn Glu
180 185 190

Lys Gly Ile Lys Phe Trp Thr Val Lys Asn Ser Trp Gly Pro Thr Trp
195 200 205

Gly Glu Lys Gly Tyr Ile His Leu Gln Arg Gly Ala Arg Lys Glu Gly
210 215 220

Leu Cys Gly Val Ala Met His Ser Ser Phe Pro Ile Met Asn Asp Pro
225 230 235 240

Asn Pro Pro Lys Asp Asp Pro Asn Gly Pro Lys Asp Glu Leu
245 250

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> propéptido natural de SH-EP

<400> 13

Asn Ser Phe Asp Phe His Glu Lys Asp Leu Glu Ser Glu Glu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Asp Leu Tyr Glu Arg Trp Arg Ser His His Thr Val Ser Arg Ser
20 25 30

Leu Gly Glu Lys His Lys Arg Phe Asn Val Phe Lys Ala Asn Val Met
35 40 45

His Val His Asn Thr Asn Lys Met Asp Lys Pro Tyr Lys Leu Lys Leu
50 55 60

Asn Lys Phe Ala Asp Met Thr Asn His Glu Phe Arg Ser Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Gly Ser Lys Val Asn His His Lys Met Phe Arg Gly Ser Gln His Gly
85 90 95

ES 2 736 035 T3

Ser Gly Thr Phe Met Tyr Glu Lys Val Gly
100 105

5 <210> 14
<211> 362
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> Preproteína AmoA11 modificada
<400> 14

ES 2 736 035 T3

Met	Glu	Ile	Asn	Lys	Leu	Val	Cys	Phe	Ser	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Ile	1	5	10	15
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Ser	Phe	His	Tyr	His	Glu	Arg	Glu	Leu	Glu	Ser	20	25	30	
Glu	Glu	Gly	Phe	Met	Gly	Met	Tyr	Asp	Arg	Trp	Arg	Glu	Gln	His	Asn	35	40	45	
Ile	Glu	Met	Arg	Ser	Pro	Glu	Arg	Phe	Asn	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Val	50	55	60	
Arg	Arg	Ile	His	Glu	Ser	Asn	Lys	Met	Asp	Lys	Pro	Tyr	Lys	Leu	Lys	65	70	75	80
Val	Asn	Glu	Phe	Ala	Asp	Met	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Tyr	85	90	95	
Ala	Asn	Ser	Lys	Ile	Ser	His	Phe	Gln	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Ala	Pro	100	105	110	
Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Asp	Phe	Ile	Tyr	Ala	Asn	Val	115	120	125	
Thr	Lys	Ile	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Trp	Arg	Glu	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	130	135	140	
Asp	Val	Lys	Gly	Gln	Gly	Gly	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ala	Ala	145	150	155	160
Val	Val	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Asn	Ala	Ile	Arg	Thr	Gly	Lys	Leu	Val	165	170	175	
Lys	Phe	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Met	Thr	Asn	Ala	Gly	180	185	190	
Cys	Asp	Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Pro	Ala	Phe	Thr	Tyr	Val	Ile	Lys	His				

ES 2 736 035 T3

195	200	205
Gly Gly Ile Ala Pro Glu Ala Ser Tyr Pro Tyr Val Gly Lys Arg Glu 210 215 220		
Thr Cys Asp Lys Ala Lys Ile Lys Asp Val Leu Lys Ile Asp Gly Arg 225 230 235 240		
Gln Asn Val Pro Gly Leu Asp Glu Glu Ala Leu Arg Lys Ala Val Ala 245 250 255		
His Gln Pro Val Ala Thr Gly Ile Gln Leu Ser Gly His Gly Leu Gln 260 265 270		
Phe Tyr Ser Glu Gly Val Tyr Thr Gly Asp Cys Gly Thr Glu Pro Asn 275 280 285		
His Gly Val Gly Ile Val Gly Tyr Gly Glu Asn Glu Lys Gly Ile Lys 290 295 300		
Phe Trp Thr Val Lys Asn Ser Trp Gly Pro Thr Trp Gly Glu Lys Gly 305 310 315 320		
Tyr Ile His Leu Gln Arg Gly Ala Arg Lys Glu Gly Leu Cys Gly Val 325 330 335		
Ala Met His Ser Ser Phe Pro Ile Met Asn Asp Pro Asn Pro Pro Lys 340 345 350		
Asp Asp Pro Asn Gly Pro Lys Asp Glu Leu 355 360		

<210> 15
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Preproteína de fusión

<400> 15

ES 2 736 035 T3

Met Ala Met Lys Lys Leu Leu Trp Val Val Leu Ser Leu Ser Leu Val
 1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Asn Ser Phe Asp Phe His Glu Lys Asp Leu Glu Ser
 20 25 30

Glu Glu Ser Leu Trp Asp Leu Tyr Glu Arg Trp Arg Ser His His Thr
 35 40 45

ES 2 736 035 T3

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

ES 2 736 035 T3

290	295	300
Pro Asn His Gly Val Gly Ile Val Gly Tyr Gly Glu Asn Glu Lys Gly		
305	310	315 320
Ile Lys Phe Trp Thr Val Lys Asn Ser Trp Gly Pro Thr Trp Gly Glu		
	325	330 335
Lys Gly Tyr Ile His Leu Gln Arg Gly Ala Arg Lys Glu Gly Leu Cys		
	340	345 350
Gly Val Ala Met His Ser Ser Phe Pro Ile Met Asn Asp Pro Asn Pro		
	355	360 365
Pro Lys Asp Asp Pro Asn Gly Pro Lys Asp Asp Pro Asp Ala Pro Lys		
	370	375 380
Asp Pro Lys Phe Lys Thr Thr Gln Arg Leu Gln Gly Ile Arg Thr Lys		
385	390	395 400
Leu Leu Glu Leu		

<210> 16

<211> 380

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Preproteína de fusión

<400> 16

ES 2 736 035 T3

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

ES 2 736 035 T3

Ser Thr Tyr Ala Gly Ser Lys Val Asn His His Lys Met Phe Arg Gly
 100 105 110
 Ser Gln His Gly Ser Gly Thr Phe Met Tyr Glu Lys Val Gly Gly Ser
 115 120 125
 Ala Pro Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Asn Lys Asp Phe Ile Tyr Ala
 130 135 140
 Asn Val Thr Lys Ile Pro Asp Lys Val Asp Trp Arg Glu Lys Asn Ala
 145 150 155 160
 Val Thr Asp Val Lys Gly Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe
 165 170 175
 Ala Ala Val Val Ala Leu Glu Gly Ile Asn Ala Ile Arg Thr Gly Lys
 180 185 190
 Leu Val Lys Phe Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp Met Thr Asn
 195 200 205
 Ala Gly Cys Asp Gly Gly Leu Met Glu Pro Ala Phe Thr Tyr Val Ile
 210 215 220
 Lys His Gly Gly Ile Ala Pro Glu Ala Ser Tyr Pro Tyr Val Gly Lys
 225 230 235 240
 Arg Glu Thr Cys Asp Lys Ala Lys Ile Lys Asp Val Leu Lys Ile Asp
 245 250 255
 Gly Arg Gln Asn Val Pro Gly Leu Asp Glu Glu Ala Leu Arg Lys Ala
 260 265 270
 Val Ala His Gln Pro Val Ala Thr Gly Ile Gln Leu Ser Gly His Gly
 275 280 285
 Leu Gln Phe Tyr Ser Glu Gly Val Tyr Thr Gly Asp Cys Gly Thr Glu
 290 295 300
 Pro Asn His Gly Val Gly Ile Val Gly Tyr Gly Glu Asn Glu Lys Gly
 305 310 315 320
 Ile Lys Phe Trp Thr Val Lys Asn Ser Trp Gly Pro Thr Trp Gly Glu
 325 330 335
 Lys Gly Tyr Ile His Leu Gln Arg Gly Ala Arg Lys Glu Gly Leu Cys

ES 2 736 035 T3

340

345

350

Gly Val Ala Met His Ser Ser Phe Pro Ile Met Asn Asp Pro Asn Pro
 355 360 365

Pro Lys Asp Asp Pro Asn Gly Pro Lys Asp Glu Leu
 370 375 380

REIVINDICACIONES

1. Célula vegetal que comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte, en la que dicha molécula de ADN no está integrada en el genoma de la célula vegetal.
2. Célula vegetal según la reivindicación 1, en la que la peptidasa se selecciona entre las peptidasas C1A de ácaros y las peptidasas C1A vegetales.
3. Célula vegetal según la reivindicación 1 o 2, en la que la peptidasa C1A se selecciona entre Der p 1, Der f1, Eur m 1, PEPC1, SH-EP, AMB, AMB A11, la secuencia SEQ ID NO: 10, la secuencia SEQ ID NO: 11, la secuencia SEQ ID NO: 12 y las proteínas que presentan al menos 70 % de identidad con una de estas últimas.
4. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la peptidasa C1A se expresa en una cantidad igual a al menos el 0,1 % de las proteínas solubles totales de la planta.
5. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende una secuencia que codifica el péptido señal, una secuencia que codifica el propéptido y una secuencia que codifica la proteína C1A madura.
6. Célula vegetal según la reivindicación 5, en la que la secuencia que codifica el péptido señal se selecciona entre el péptido señal natural de la peptidasa y el péptido señal de la quitinasa de tabaco; y el propéptido se selecciona entre los propéptidos naturales de peptidasas C1A, el propéptido natural de SH-EP (secuencia SEQ ID NO: 13), la secuencia SEQ ID NO: 8, la secuencia SEQ ID NO: 9 y la secuencia SEQ ID NO: 8 o 9 mutada en la asparagina 16.
7. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende además una secuencia peptídica de direccionamiento que dirige la peptidasa C1A, en forma soluble o de membrana, hacia el retículo endoplasmático o a los diferentes compartimentos que constituyen el sistema endomembranoso de secreción de la célula vegetal.
8. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un vector de expresión que comprende:
 - elementos de ADN procariota que codifica un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
 - la secuencia de nucleótidos heteróloga como se define en una de las reivindicaciones anteriores;
 - un casete de expresión que permite la expresión de un supresor de silenciamiento, preferentemente p19; y
 - elementos de ADN que controlan el tratamiento de transcritos, como secuencias de terminación/poliadenilación, preferentemente la secuencia Tnos.
9. Planta que comprende al menos una célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Procedimiento para producir una peptidasa C1A, que comprende la expresión de dicha peptidasa C1A en una célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 8, o en una planta según la reivindicación 9.
11. Procedimiento para producir una peptidasa C1A según la reivindicación 10, que comprende las siguientes etapas:
 - a) transformación de agrobacterias con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una preproteína de una peptidasa C1A unida operativamente a un promotor fuerte; y
 - b) transfección de la célula vegetal o de la planta con las agrobacterias obtenidas en la etapa a).
12. Procedimiento para producir una peptidasa C1A según la reivindicación 10 u 11, en el que las agrobacterias utilizadas en la etapa a) se seleccionan entre las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 y C58, y en el que la transfección de la etapa b) comprende preferentemente las siguientes etapas:
 - b1) cultivar la célula vegetal o la planta, en aeroponía o hidroponía, y con luz LED, preferentemente durante cinco semanas en hidroponía sobre flotadores libres,
 - b2) agroinfiltrar al vacío la célula vegetal o la planta obtenida en b1), mediante las agrobacterias obtenidas en la etapa a); y
 - b3) volver a cultivar la célula vegetal o la planta obtenida en b2), normalmente durante 4 a 6 días.
13. Uso de una peptidasa obtenida mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 12 en un método para diagnosticar alergias, en particular, alergias a ácaros o alergias a determinadas plantas.

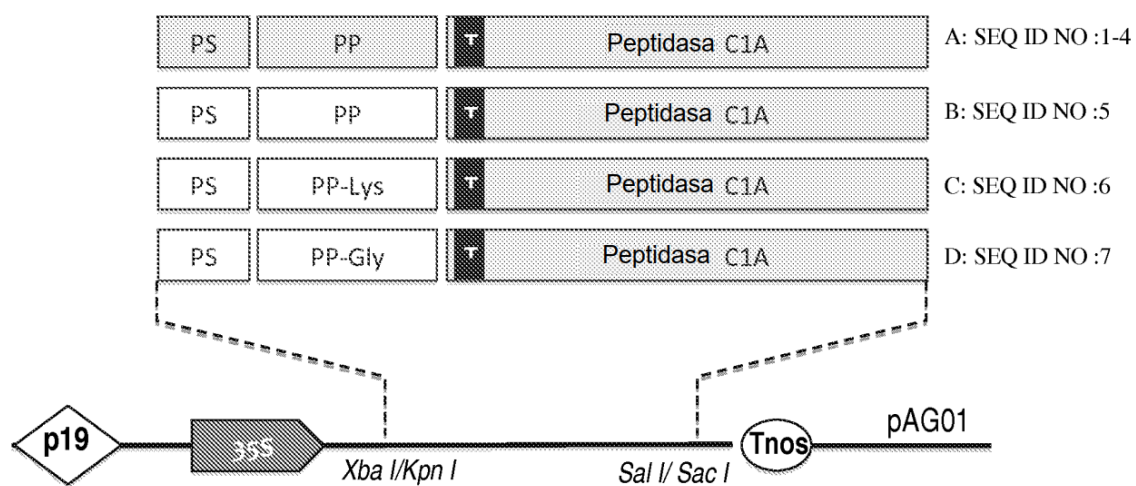


Figura 1

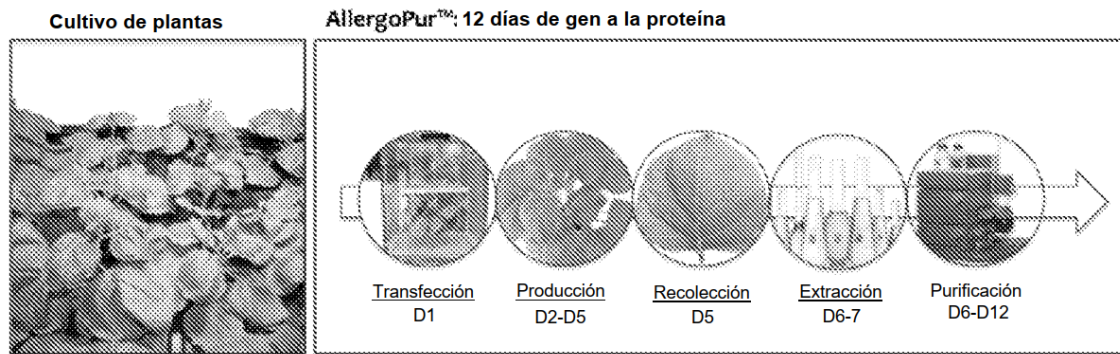


Figura 2

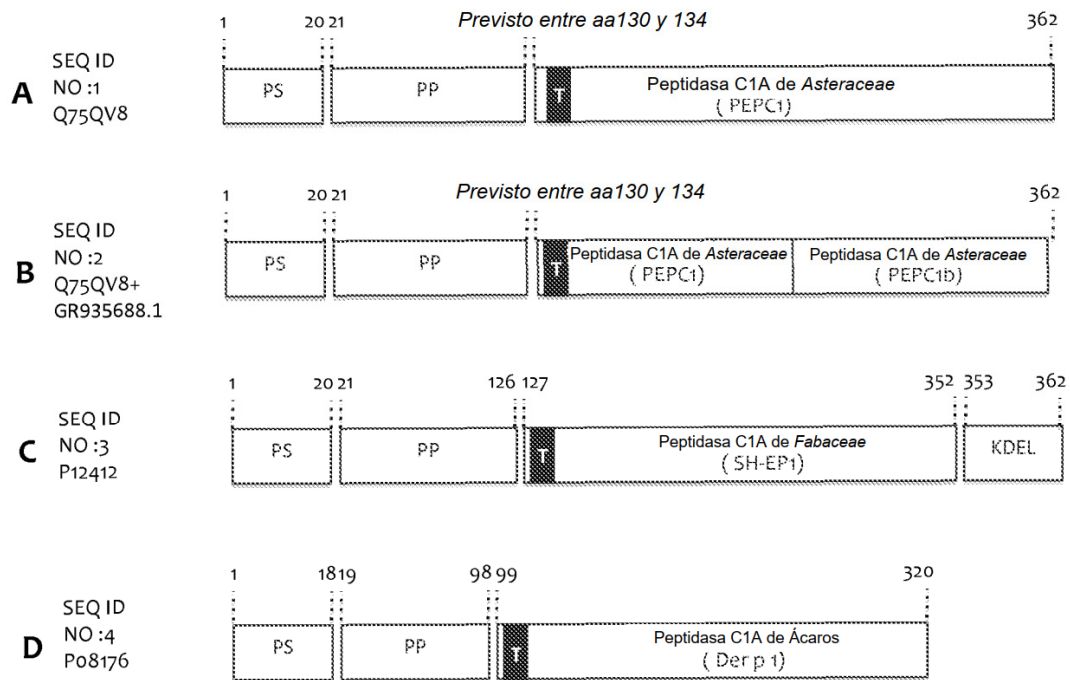


Figura 3

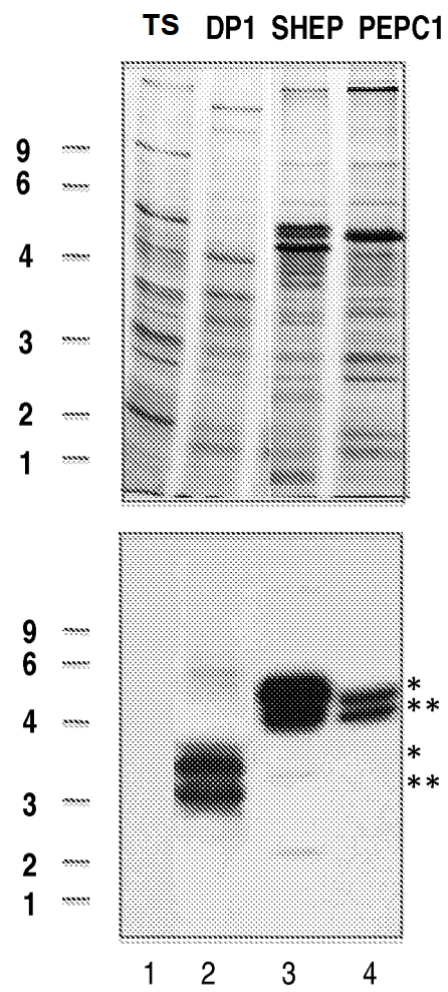


Figura 4

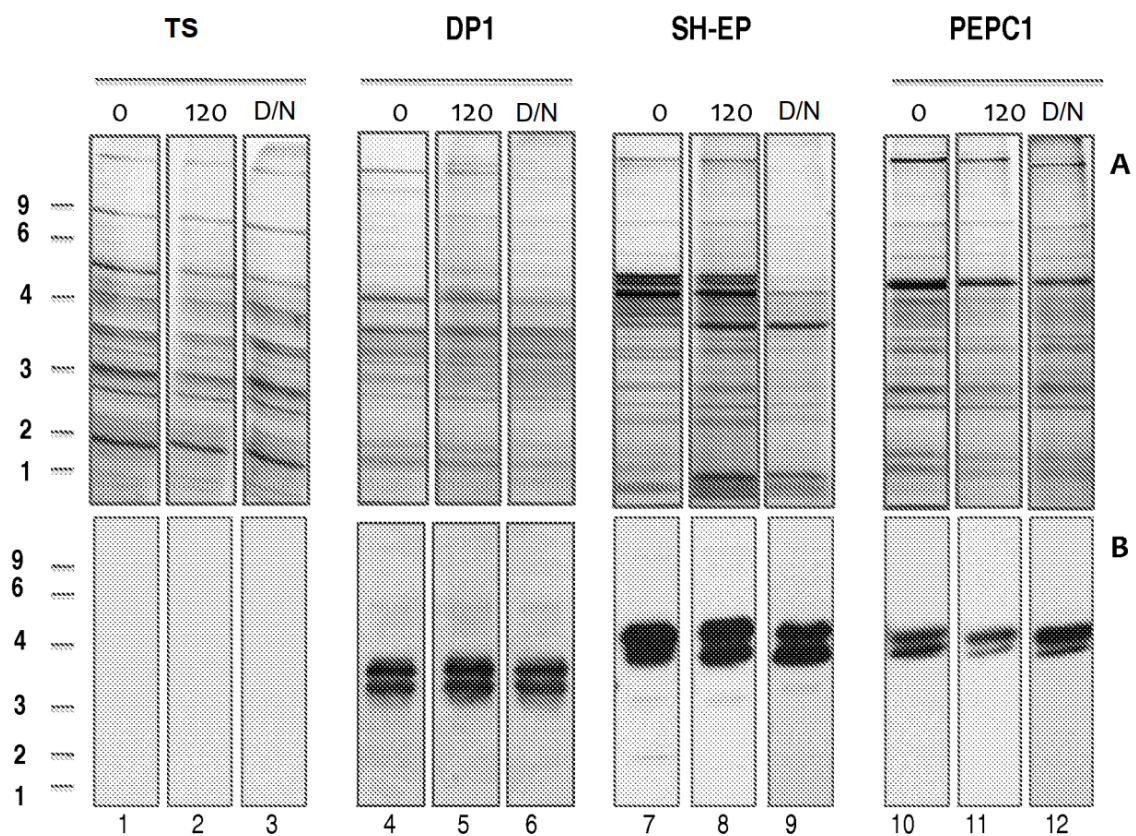


Figura 5

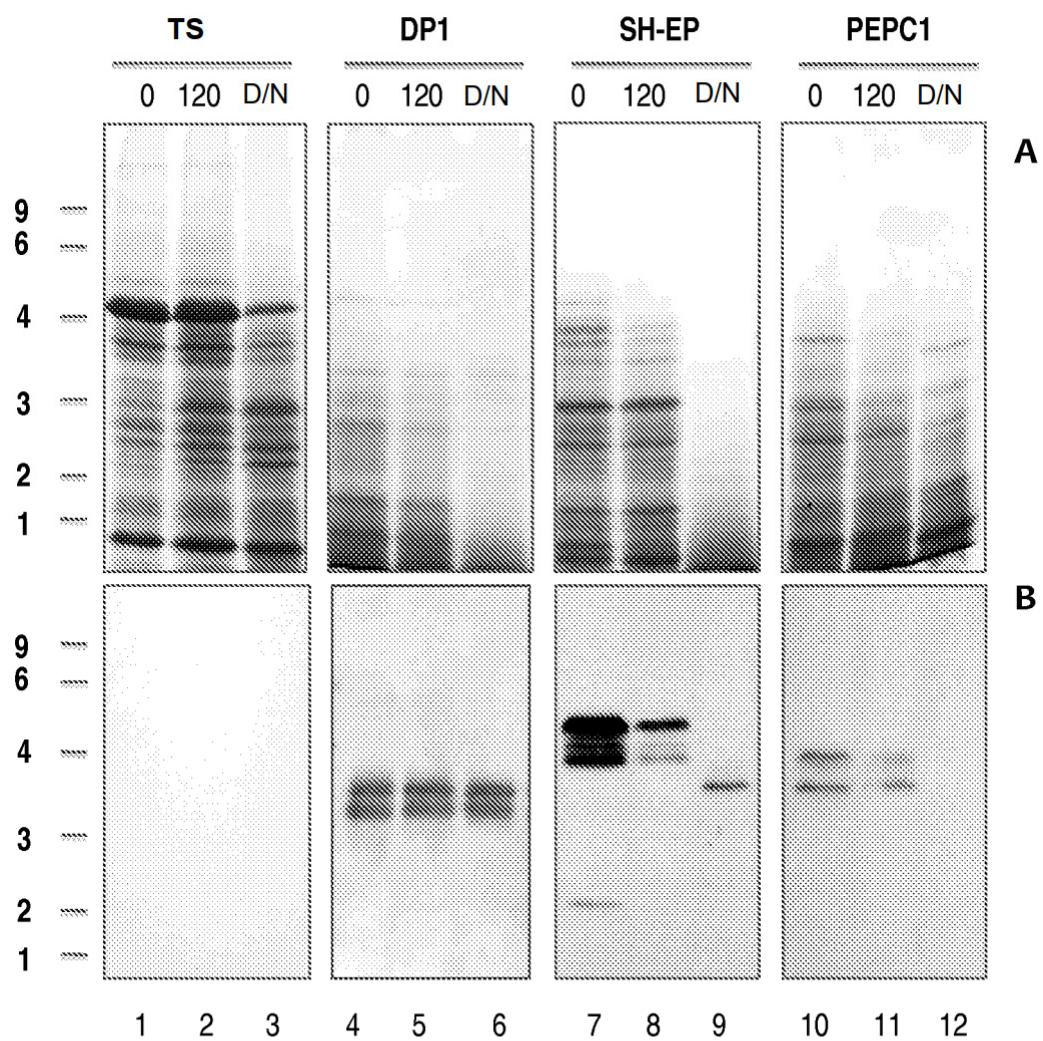


Figura 6

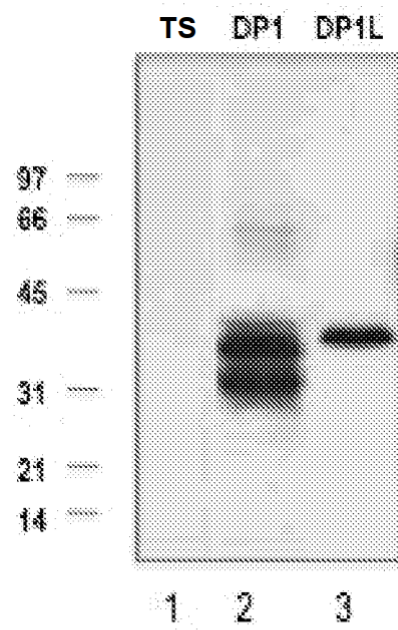


Figura 7

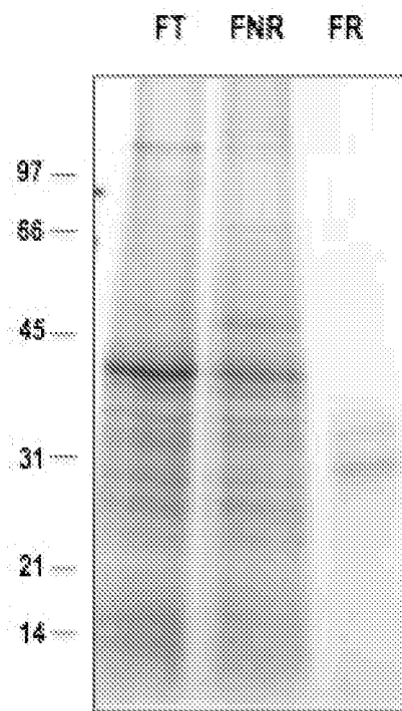


Figura 8