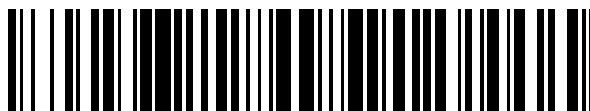


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 861**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/FR2015/051319**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177464**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15732775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3145948**

54 Título: **Producción comercial del alergeno Amb a1 por expresión transitoria en plantas**

30 Prioridad:

23.05.2014 FR 1454653

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

08.09.2020

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 2 781 861 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 del alérgeno Amb a1 por 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 nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa elegida entre Amb a 1, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1, y los homólogos de Amb a 1, unida funcionalmente a un promotor fuerte, dicha molécula de ADN no estando integrada en el genoma de la célula vegetal. La invención también se refiere a un método de producción de pectato liasa usando la célula vegetal.

Estado de la técnica

15 La ambrosía, en particular *Ambrosia artemisiifolia*, es una planta anual, que pertenece a la familia de plantas compuestas tubulifloras (o Asteráceas). Esta planta silvestre, originaria de Norteamérica, florece desde finales del verano hasta el otoño. Su polen tiene un poder alérgico muy alto. Por tanto, la ambrosía es la principal causa de alergia al polen en Estados Unidos, con aproximadamente 30 millones de cada 40 millones de personas que sufren de polinosis. Introducida involuntariamente en Francia en el siglo XIX, la ambrosía es una planta altamente invasiva que ha progresado rápidamente desde la región de Rhône-Alpes hasta el norte de Francia. Por tanto, en 2011, se encontraron matas de ambrosía en Ile de France.

En personas sensibles en polen de esta planta provoca en personas sensibles una reacción alérgica caracterizada por su gravedad. En general, la rinitis alérgica por ambrosía es mucho más grave que la causada por otros pólenes. Síntomas como prurito, anosmia (pérdida o disminución de la sensibilidad a los olores), rinorrea, estornudos y bloqueo nasal son más importantes. Además, en el 50 % de los casos, esta alergia evoluciona a asma, a menudo más grave que el causado por otros pólenes. Estos síntomas son más pronunciados cuanto mayor es el nivel de polen en el aire.

En la región de Rhône-Alpes, la alergia a la ambrosía actualmente afecta del 6 al 12 % de la población entre finales de agosto y principios de septiembre. Por tanto, solo para esta región, el número total de consumidores de medicamentos antialérgicos para ambrosía aumentó bruscamente (+60 %) entre 2008 y 2011, pasando de 161.200 a 258.700 personas, y los gastos de salud causados por esta alergia representan entre 5,6 y 8,6 millones de euros. Por tanto la alergia a la ambrosía representa actualmente un verdadero problema de salud pública. La forma más fácil de protegerse de los riesgos de alergia sería evitar la exposición al polen de ambrosía, pero una eliminación total ya parece imposible a pesar de las órdenes prefecturales que hacen obligatoria la destrucción de la ambrosía. Estas medidas no detuvieron la propagación de esta planta invasora en una gran cantidad de regiones.

Los llamados tratamientos "sintomáticos" ya sea vía local (gotas, colirios, aerosoles), ya sea por vía general (comprimidos, cápsulas), ayuda a aliviar los síntomas durante el periodo de polen en el aire. Pero los síntomas regresan rápidamente en cuanto se suspende el tratamiento. A diferencia de los tratamientos "sintomáticos", la inmunoterapia con alérgenos (o desensibilización) es el único tratamiento capaz de modificar el curso de la enfermedad alérgica. Esta ruta terapéutica hace posible tratar la causa de la alergia a diferencia de los llamados medicamentos "sintomáticos". No obstante, como con otras alergias, los extractos utilizados actualmente para la desensibilización de pacientes alérgicos a la ambrosía son de calidad insuficiente para que este tratamiento sea eficaz. Se han caracterizado varios alérgenos de ambrosía, en particular, Amb a 1, responsable de más del 80 % de los casos de alergia a la ambrosía. Varios intentos para producir un Amb a 1 recombinante para desensibilización específica han fracasado. En efecto, Amb a 1 es una proteína vegetal compleja con una maduración típicamente post-traduccional de la planta, y solo un sistema de expresión de la planta podrá producir este alérgeno en una forma que pueda usarse y sea eficaz en la inmunoterapia con alérgenos.

Por tanto existe la necesidad de producir este alérgeno Amb a 1 en forma recombinante, con buena calidad, y de manera reproducible y eficaz (con buen rendimiento). Por "buena calidad", se entiende que el alérgeno es muy similar, en su secuencia y estructura, al alérgeno presente naturalmente en la ambrosía. También es necesario producir este alérgeno a niveles comercial y económicamente aceptables.

Objeto de la invención

De forma sorprendente, los inventores han descubierto ahora que la producción del alérgeno Amb a 1, aunque tóxico *in vivo*, en forma recombinante es posible, mediante expresión transitoria en plantas. Esta producción, que se realiza en una célula vegetal, permite obtener el alérgeno Amb a 1 en forma madura y activa, con un buen rendimiento, de manera muy sencilla y reproducible. Asimismo, el alérgeno Amb a 1 obtenido no está contaminado por proteasas y/u otros contaminantes de origen vegetal. De esta manera, los inventores han podido obtener una producción, a niveles comercialmente aceptables, del alérgeno Amb a 1.

Por tanto el objeto de la invención es una célula vegetal que comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa elegida entre Amb

a 1, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1, y los homólogos de Amb a 1, unida funcionalmente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S. La molécula de ADN unida al promotor fuerte permite expresar transitoriamente la pectato liasa 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 nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de pectato liasa unida operativamente a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S, dicha molécula de ADN no estando integrada en el genoma de la célula vegetal.

La pectato liasa elegida entre Amb a 1, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1, y los homólogos de Amb a 1 se denominan "pectato liasa según la invención" en la presente solicitud.

La invención también se refiere a una planta que comprende al menos una célula vegetal según la invención. Otro objeto de la invención es proporcionar un método para producir una pectato liasa, que comprende la expresión de dicha pectato liasa en una célula vegetal según la invención, o en una planta que comprende dicha célula.

Una pectato liasa susceptible de atención con el método según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención puede usarse como medicamento. También puede usarse en inmunoterapia alérgica, sola o en combinación con al menos otro alérgeno de Asteráceas. También se puede utilizar 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, para que el promotor fuerte induzca la transcripción de la molécula de ADN.

Esto permite la expresión de dicha molécula de ADN en forma transitoria, es decir, sin integración de ADN, incluyendo ADNc, en el genoma de la célula vegetal. En efecto, el uso de la expresión transitoria en una célula vegetal o una planta según la invención hace posible aumentar los rendimientos de producción de la pectato liasa según la invención en forma activa hasta niveles altos, compatibles con un aprovechamiento comercial, pero incompatibles con la supervivencia de una planta que expresaría estas pectato liasa tóxicas de manera estable. En el caso de una expresión transitoria, la recolección de 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 nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa según la invención unida de manera funcional a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S.

Amb a 1 es una pectato liasa de *Ambrosia artemisiifolia*. Reconocido por más de 80 % pacientes sensibilizados a la ambrosía, este alérgeno es responsable de más del 90 % de la actividad alérgica del polen de ambrosía. Es una proteína de 38 kDa descrita como no glicosilada que pertenece a la familia de las pectato liasas. Hay un inventario de doce isoformas de Amb a 1, de Amb a 1.0101 a Amb a 1.0502 (según el sitio web www.allergome.org).

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las doce isoformas se detallan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: las doce isoformas de Amb a 1, sus secuencias nucleicas y proteicas

Isoalergenos	Número de acceso (GenBank) Secuencia nuclear	Número de acceso (UniProt) Secuencia de aminoácidos
Amb a 1.0101	M80558	P27759
Amb a 1.0201	M62981	P27760
Amb a 1.0202	FR669658	E1XUL3
Amb a 1.0301	M62961	P27761
Amb a 1.0302		P27761 (variante L48Y)
Amb a 1.0303	M80560	P27761 (variante H392R)
Amb a 1.0304	FR669659	E1XUL4
Amb a 1.0305	FR669660	E1XUL5
Amb a 1.0401	M80562	P28744
Amb a 1.0402	FR669664	E1XUL9
Amb a 1.0501	M80561	P27762
Amb a 1.0502	FR669666	E1XUM1

Por "Amb a 1" según la invención, se entienden las doce isoformas mencionadas anteriormente en la tabla 1 anterior.

Las secuencias proteicas descritas en esta tabla 1 corresponden a las preproteínas de las diversas isoformas.

- Amb a 1 sufre proteólisis en el grano de polen y/o durante el proceso de extracción o purificación dando como resultado dos cadenas, alfa (26 kDa) y beta (12 kDa), asociadas no covalentemente (King *et al*, 1974, 1981). Se ha demostrado que las modificaciones químicas de Amb a 1, incluyendo reducción y alquilación de los puentes disulfuro, así como el proceso de desnaturalización/renaturalización por urea o succinilación de restos de lisina, reduce su reactividad hacia IgE (King, 1976; Smith *et al*, 1988). Las subcadenas alfa y beta de Amb a 1 tienen una reactividad diferente en IgE y linfocitos T. En efecto, Amb a 1 beta contiene una gran cantidad de epítomos de unión a IgE, mientras que Amb a 1 alfa se comporta como un hipoalergeno y estimula la actividad de los linfocitos T.
- Preferentemente, Amb a 1 tiene la secuencia proteica SEQ ID NO: 7 (preproteína). Preferentemente, la subunidad beta tiene la secuencia proteica SEQ ID NO: 8. Preferentemente, la subunidad alfa tiene la secuencia proteica SEQ ID NO: 9.
- Por "homólogos de Amb a 1", se entiende proteínas de la familia Asteráceas que tienen al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1. Preferentemente, el homólogo de Amb a 1 es una proteína vegetal del género *Ambrosia* o *Artemisia*, más preferentemente de *Artemisia vulgaris*, de *Ambrosia psilostachya* o *Ambrosia trifida*, que tiene al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1. Preferentemente, el homólogo de Amb a 1 se elige entre Amb p 1 (procedente de *Ambrosia psilostachya*, de código de acceso 9064 en www.allergome.org) y Art v 6 (procedente de *Artemisia vulgaris*, número de acceso A0PJ16 en Uniprot).
- Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos en el sentido de la presente invención, se pretende 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 la cual el porcentaje de identidad determinado a continuación es el más alto.
- Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realizan tradicionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, realizándose dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Para comparación se puede conseguir una alineación óptima de las secuencias, además de manualmente, utilizando el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981, J. Mol Evol., 18:38-46), utilizando 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).
- Por tanto, preferentemente, la pectato liasa según la invención se elige entre Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1 y las proteínas de la familia de las Asteráceas que tienen al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1.
- Más preferentemente, la pectato liasa según la invención se elige entre Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1 y las proteínas de *Artemisia vulgaris*, *Ambrosia psilostachya* o *Ambrosia trifida*, que tienen al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1.
- La molécula de ADN comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de pectato liasa según la invención.
- La preproteína pectato liasa según la invención comprende un péptido señal, un propéptido y pectato liasa madura. La secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la preproteína según la invención comprende, por tanto, una secuencia que codifica el péptido señal, una secuencia que codifica el propéptido y una secuencia que codifica la pectato liasa madura. Preferentemente, la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la preproteína según la invención comprende una secuencia que codifica el péptido señal, una secuencia que codifica el propéptido de la subunidad beta, una secuencia que codifica la subunidad beta, una secuencia que codifica el propéptido de la subunidad alfa y una secuencia que codifica la subunidad alfa.
- El péptido señal es, en particular, cualquier péptido señal reconocido por la célula vegetal, ya sea de una pectato liasa o no. En particular se dirige a la pectato liasa según la invención en el medio intercelular. Preferentemente, el péptido señal es el de la quitinasa del tabaco, o el péptido señal natural de la pectato liasa.
- El propéptido es, en lo que respecta al mismo, el propéptido natural de una pectato liasa, o bien el propéptido de una peptidasa C1A. En una realización preferida, el propéptido es un propéptido de peptidasas C1A, en particular de ácaros o de origen vegetal. Preferentemente, el propéptido de peptidasa C1A es el propéptido natural o el propéptido mutado o no de Der p1. Preferentemente, el propéptido de peptidasa C1A se elige entre el propéptido natural de peptidasa

C1A y la secuencia SEQ ID NO: 6 (es decir, los aminoácidos 19 a 98 de la secuencia Uniprot p08176). En una realización preferida de la presente invención, la pectato liasa según la invención se produce en fusión con su propio propéptido o en fusión con el propéptido de peptidasa C1A de ácaros o en fusión con un propéptido de planta peptidasa C1A, para aumentar los rendimientos de producción de la proteína.

5 Preferentemente, la secuencia de la preproteína pectato liasa se elige entre las secuencias proteicas enumeradas en la Tabla 1 anterior y secuencias que tienen al menos 57 %, preferentemente al menos 60 %, preferentemente al menos 64 % de identidad con una de estas.

10 Preferentemente, la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la preproteína se elige entre SEQ ID NO: 1 a 5. Preferentemente, su secuencia es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

Según la invención, la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la preproteína puede obtenerse a partir de un gen conocido ya clonado que codifica una pectato liasa según la invención, o bien seleccionando una biblioteca de ADNc con anticuerpos anti-pectato liasa. Los métodos utilizados son bien conocidos por los expertos en la materia, y en particular incluyen 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 preferentes en plantas; en este caso, hablamos 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)).

20 En una realización preferente de la invención, la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la preproteína comprende además una secuencia, llamada secuencia de direccionamiento intracelular. Esta secuencia hace posible dirigirse a un compartimento de almacenamiento de pectato liasa según la invención, para controlar su maduración. Esta maduración es necesaria para obtener pectato liasa en la forma más adecuada para el diagnóstico de alergia e inmunoterapia. Preferentemente, esta secuencia peptídica dirigida se dirige a la pectato liasa según la invención en forma soluble o de membrana hacia el retículo endoplásmico o los diversos compartimentos que constituyen el sistema secretor de endomembrana de la célula vegetal.

30 Una vez que el gen de interés ha sido aislado y modificado para contener todas o parte de las modificaciones descritas anteriormente y para obtener la secuencia nucleotídica heteróloga, este último se coloca en un vector de expresión mediante 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 procariótico que codifican un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico que se suministrará para crecimiento y selección del vector de expresión en el hospedador bacteriano, un sitio de clonación para inserción de una secuencia de ADN exógeno que codifica pectato liasa; elementos de ADN eucariotas, como una secuencia de inicio para transcripción del gen exógeno, como promotor y elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, como secuencias de terminación/poliadenilación y un casete de expresión que permite la expresión de un inhibidor de silenciamiento. También contiene secuencias como t-ADN que son necesarias para la integración de un fragmento de ADN en la planta o en la célula de la planta.

40 Preferentemente, el vector de expresión comprende:

- elementos del ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
- al menos una secuencia nucleotídica heterólogos que codifica una preproteína de una pectato liasa de acuerdo con la invención unida de manera funcional a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S;
- un casete de expresión que permite la expresión de un inhibidor de silenciamiento, preferentemente p19; y
- elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, 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 la pectato liasa son promotores fuertes y pueden ser promotores de genes vegetales, tales como, por ejemplo, el promotor de ubiquitina, el promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa, promotores de *Agrobacterium tumefaciens*, promotores de nopalina sintasa y octopina sintasa, o promotores virales como los 19S y 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Preferentemente, el promotor fuerte es 35S.

60 La alta expresión y la calidad de las pectato liasa recombinantes producidas en la invención hacen posible concebir su producción comercial. En efecto, la pectato liasa según la invención se expresa típicamente en una cantidad igual a al menos 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.

65 La planta o las células vegetales según la invención pueden usarse como tales, como medicamento. La planta o las

5 células vegetales según la invención pueden usarse como tales, para aplicaciones como biocombustible, en nutrición animal, o en la producción de papel o textiles (fibras de algodón en particular). En otras aplicaciones, la pectato liasa recombinante se purifica después de la extracción de la planta o las células vegetales que la expresan. Para facilitar su purificación, la enzima puede expresarse en fusión con etiquetas (His6, GST, MBP, FLAA etc.) que se localizarán preferentemente en la posición N o C-terminal de la proteína madura.

10 La pectato liasa susceptible de obtención con el método según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención, puede utilizarse como un medicamento. También puede usarse en inmunoterapia alérgica, sola o en combinación con al menos otro alérgeno de Asteráceas. Este otro alérgeno de Asteráceas puede elegirse entre Amb a 11, Amb a 5 y sus mezclas.

15 También se puede utilizar en el diagnóstico de alergias, incluyendo alergias al polen. Por tanto, la presente descripción también divulga un kit de diagnóstico de alergia, que comprende la pectato liasa susceptible de obtención con el método según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención, y medios para medir los anticuerpos dirigidos contra esta proteína. También se describe un kit de diagnóstico de alergia, que comprende la pectato liasa susceptible de obtención con el método según la invención, con una célula vegetal según la invención, o con una planta según la invención, medios para medir los anticuerpos dirigidos contra esta proteína, y medios para medir los anticuerpos dirigidos contra otro alérgeno de Asteráceas, por ejemplo el alérgeno Amb a 11 o Amb a 5.

20 Métodos generales de cultivo de plantas, así como métodos para introducir vectores de expresión en el tejido vegetal, están disponibles para los expertos en la materia. Son variados y dependen 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 pectato liasa según la invención. Esta etapa de agroinfiltración puede realizarse mediante cualquier medio que permita realizar vacío. Preferentemente, el método utilizado según la invención, se realiza al vacío por efecto Venturi. Entre las agrobacterias que pueden usarse según la invención, pueden mencionarse, preferentemente, las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 o C58. Según una primera alternativa, una vez realizada la etapa de agroinfiltración, normalmente las plantas se ponen a escurrir boca abajo durante 15 minutos, y después vuelven a cultivarse, típicamente de 3 a 6 días, idealmente asegurando la nebulización frecuente de estas últimas durante las primeras 6 horas de cultivo después de la agroinfiltración. Finalmente, la proteína se extrae y se purifica. Preferentemente, la proteína se extrae y purifica como se describe en la solicitud FR1255510. Según una segunda alternativa, una vez realizada la etapa de agroinfiltración, las plantas se devuelven inmediatamente al cultivo, típicamente de 3 a 6 días, entonces la proteína se extrae y se purifica. La extracción de proteínas puede realizarse moliendo las hojas o, alternativamente, mediante un proceso de infiltración enzimática.

35 En tal proceso que usa infiltración enzimática, la extracción de proteínas se realiza mediante las siguientes etapas:

- 40
- infiltración al vacío (en particular como se describió anteriormente para la agroinfiltración) de la parte aérea de las plantas, en una solución enzimática que contiene una pectinasa o macerozima, que no tiene actividad proteolítica. Preferentemente, la pectinasa es la P162L comercializada por Biocatalyst, formulada al 4 % en un medio que comprende citrato sódico 50 mM, pH 5,2, NaCl 0,5 M y metabisulfito al 0,04 %. Preferentemente, la macerozima se formula al 0,5 % en un medio que comprende 50 mM de citrato sódico pH 5,2, NaCl 0,5 M y metabisulfito al 0,04 %, muestreo de las hojas de las plantas infiltradas e incubación en una solución enzimática de pectinasa o de macerozima, durante un periodo entre 2h30 y 5 h, preferentemente 3h o 4h30, a una temperatura entre 24 °C y 30 °C, preferentemente 26 °C, después
 - 45 - agitación de la mezcla obtenida entre 20 y 30 rpm a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 20-23 °C) durante un periodo entre 30 minutos y 2 h,
 - 50 - el digestato se filtra, preferentemente en un tejido de 250 µm, luego se centrifuga a opcionalmente (por ejemplo a 250xg durante 10 minutos),
 - el sobrenadante se recoge para realizar una filtración profunda, preferentemente en un filtro K100 (comercializado por Pall). Preferentemente, el filtrado se concentra 20 veces en un casete de 5 kDa y su pH se ajusta a 7 con Na3PO4.
- 55

Los alergenos Amb a 1 y Amb a 11 se pueden purificar por cromatografía de los extractos como se describe en la solicitud FR 1255510.

60 Por tanto, preferentemente, el objeto de la invención es también un método para producir una pectato liasa en una célula vegetal o una planta, que comprende las siguientes etapas:

- 65
- a) transformación de agrobacterias con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa según la invención 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 se pueden usar en la etapa a) se eligen entre las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 y C58. Preferentemente, el vector de expresión utilizado en la etapa a) comprende:

- 5
- elementos del ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
 - al menos una secuencia nucleotídica heterólogos que codifica una preproteína de una pectato liasa de acuerdo con la invención unida de manera funcional a un promotor fuerte, preferentemente un promotor 35S;
 - un casete de expresión que permite la expresión de un inhibidor de silenciamiento, preferentemente p19; y
- 10
- elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, como secuencias de terminación/poliadenilación, preferentemente la secuencia Tnos.

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

15

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

- 20
- b1) cultivar la célula vegetal o la planta, en aeroponía o hidroponía, y bajo iluminación LED, preferentemente durante cinco semanas en hidroponía sobre flotadores libres,
 - b2) agroinfiltrar al vacío la célula vegetal o la planta obtenida en b1), con las agrobacterias obtenidas en la etapa a). Esta etapa de agroinfiltración se realiza, preferentemente, al vacío por efecto Venturi.
 - b3) volver a cultivar la célula vegetal o la planta obtenida en b2), típicamente de 3 a 6 días.

Finalmente, preferentemente, la pectato liasa así producida se extrae y purifica.

- 25
- Preferentemente, el método para producir una pectato liasa según la invención en una célula vegetal o una planta, comprende además una etapa c) de extracción de la pectato liasa producida, dicha etapa c) comprendiendo las siguientes etapas:

- 30
- infiltración al vacío de la célula u hojas de la planta (es decir, parte aérea) de la planta, en una solución enzimática que contiene una pectinasa o macerozima, que no tiene actividad proteolítica. Preferentemente, la pectinasa o la macerozima son como se describieron anteriormente,
 - eliminación de la célula vegetal infiltrada u hojas de la planta infiltrada e incubación, en una solución enzimática de pectinasa o macerozima, durante un periodo entre 2h30 y 5 h, a una temperatura entre 24 °C y 30 °C, después
- 35
- agitación de la mezcla obtenida entre 20 y 30 rpm a temperatura ambiente durante un periodo entre 30 minutos y 2 h,
 - filtración, luego opcionalmente centrifugación del digestato obtenido, y
 - recuperación del sobrenadante.

40 Descripción de las figuras

Los siguientes ejemplos, ilustran, pero no pretenden limitar el alcance de la invención. Para los expertos en la materia será evidente que son posibles variaciones y modificaciones.

- 45 Las leyendas de las figuras son las siguientes:

Figura 1: Representación esquemática de los diferentes casetes que permiten producir una pectato liasa Amb a 1 madura y activa (A, B, C, F y G) o la subunidad alfa (E e I) o la subunidad beta (D y H), usando el péptido señal y el propéptido de proteína natural (A-F), ya sea el péptido señal de quitinasa de tabaco y un propéptido de la familia de las peptidasas C1A (G -I) para aumentar los rendimientos. La pectato liasa también se produce en forma mutada en lisina 180 (K180) para limitar la proteólisis permitiendo la producción de subunidades alfa y beta (F).

- 55
- A (SEQ ID NO: 1): ADNc que codifica la preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,
 - B (SEQ ID NO: 2): ADNc optimizado para uso en *N. Benthamiana*, que codifica la preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,
 - C (SEQ ID: 3): ADNc armonizado que codifica la forma preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7). Este ADNc contiene codones optimizados para uso en *N. Benthamiana*, pero también incluye codones raros, para preservar la tasa de síntesis de proteínas para una mejor conservación de la estructura 3D. Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265,
 - D (SEQ ID NO: 4): Codificación de ADNc nativo/optimizado/armonizado para la subunidad beta (de secuencia SEQ ID NO: 8). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.
 - E (SEQ ID NO: 5): Codificación de ADNc nativo/optimizado/armonizado para la subunidad alfa (de secuencia
- 60
- 65

SEQ ID NO: 9). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

F: ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la forma mutada (K180) de la proteína. Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

G: ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la forma madura de la proteína 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: 6). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

H: ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la subunidad beta de la proteína 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: 6). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

I: ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la subunidad alfa de la proteína 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: 6). Este ADNc se puede combinar con las señales de direccionamiento descritas en la solicitud WO2008/056265.

Figura 2: Plataforma AllergoPur utilizada para expresión y producción de las diferentes formas de pectato liasa según la invención.

Figura 3: Expresión de la proteína Amb a 1. Proteínas extraídas de plantas transfectadas con ADNc nativo (F1-F3), por ADNc optimizado (F4-F6) o por ADNc armonizado (F7-F9) que codifica la proteína Amb a 1 se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una etiqueta Flag. El análisis de inmunodetección destaca la producción específica de la proteína Amb a 1 y la subunidad alfa. En esta transferencia no se inmunodetecta la subunidad beta escindida.

Figura 4: Purificación del alergeno Amb a 1. Las proteínas extraídas de las plantas se transfectaron al vacío con el ADNc armonizado que codifica la proteína Amb 1 por cromatografía IMAC. Luego las fracciones retenidas en la columna se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Dada la posición C-terminal de Flag, dos polipéptidos correspondientes a la forma precursora (preproteína) (Amb a 1p) y a la subunidad alfa se purifican del extracto transfectado con el ADNc completo (carril 3). Estos dos polipéptidos (Amb a 1 alfa y Amb a 1p) se separan luego (carriles 4 y 5 respectivamente) mediante cromatografía de tamizado molecular. Los dos polipéptidos producidos exhiben una movilidad electroforética ligeramente menor que las proteínas nativas. Esta diferencia se explica por la presencia de Flag en la posición C-terminal.

Figura 5: Expresión del alergeno Amb a 11. Las proteínas extraídas de 3 plantas (P1-P3) transfectadas con el ADNc que codifica el alergeno Amb a 11 se separaron por electroforesis SDS-PAGE. Los extractos de proteínas se analizan en cuanto se extraen (0H) o después de una incubación de 12h (12H) a temperatura ambiente. La incubación a temperatura ambiente destaca la acumulación de dos polipéptidos correspondientes a Amb a 11, así como la degradación casi total de las proteínas de *N. Benthamiana*. Por tanto, el alergeno Amb a 11 se produce en forma activa según el mismo proceso que el descrito actualmente para Amb a 1.

Descripción detallada de la invención

EJEMPLO:

Diseño molecular y síntesis de genes

Los ADNc se sintetizan en forma nativa, optimizando el uso de codones para su reconocimiento por el sistema de la planta o armonizando el uso de codones (reintroducción de codones raros para estimular la síntesis de la proteína). En el contexto de esta invención, la optimización preferente 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 se integran 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 cadena arriba de un promotor 35S (35S) y cadena abajo de una secuencia de terminación de nopalina sintasa (Tnos); el vector pAG01 contiene además un casete de expresión que hace posible expresar el inhibidor de silenciamiento p19 simultáneamente con la proteína recombinante para aumentar los rendimientos de producción. Los vectores se usan para transformar la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Expresión transitoria de pectato liasas según la invención en hojas de *Nicotiana benthamiana* - Uso de la plataforma AllergoPur

Para producción por expresión transitoria se usa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* para la transferencia de un

ADNc que codifica la pectato liasa sin que el gen de interés se integre en el genoma de la célula vegetal: aquí se habla de transfección y no de transgénesis. Las plantas se cultivan en condiciones hidropónicas en presencia de un medio nutriente (GHE, floragrow, floramico, florabloom, 10 ml/15 ml/5 ml para 10 l de agua osmotizada) y bajo iluminación LED.

5 La agrobacteria se transfiere al tejido de la hoja por agroinfiltración según dos métodos. Para producción de pequeños lotes de pectato liasas destinadas a la detección de prototipos, las agrobacterias se inyectan manualmente con una jeringa aplicada contra la epidermis de la parte inferior de la hoja. Los discos foliares tomados de las hojas 4 a 6 días después de la agroinfiltración se usan para el análisis de los diferentes prototipos de pectato liasas. Esta etapa de selección permite definir el vector de expresión que se utilizará para obtener una pectato liasa de calidad óptima. El mismo método se utiliza para la producción comercial a gran escala pero, en este caso, la agroinfiltración se realiza al vacío, en recintos que contienen varios litros de un cultivo de agrobacterias y donde varias decenas de plantas se infiltran simultáneamente. Estas plantas se vuelven a poner en cultivo durante 4 a 6 días antes de la purificación de las pectato liasa de los extractos de hojas (Figura 2).

15 **Expresión de la pectato liasa Amb a 1 y sus subunidades**

La expresión de proteínas y los rendimientos se analizan mediante transferencia Western y ELISA respectivamente. Los resultados se ilustran para las 3 formas de ADNc que codifican la proteína natural (Figura 3).

20 Las proteínas expresadas son activas. En efecto, la expresión de Amb a 1 causa una necrosis significativa a partir del 4º día de expresión en comparación con las plantas de control. Estas necrosis se deben a una fuerte actividad de la pectato liasa (Liu *et al*, 2010).

25 **Purificación y caracterización**

Como se muestra en la Figura 4, las pectasas se extraen de biomasa fresca o congelada y luego se purifican en una columna IMAC (HisTrap Excell).

30 Esta purificación permite la producción de la forma precursora (preproteína) y la subunidad alfa.

Finalmente, como se muestra en la Figura 5, es posible combinar los alérgenos Amb a 1 y Amb a 11 obtenidos por el método según la invención, para obtener una composición que pueda usarse en inmunoterapia alérgica. Estos alérgenos se pueden producir y purificar después de la extracción mecánica como se describe en la solicitud FR1255510, o según la alternativa de extracción por infiltración enzimática como se describe en la presente solicitud.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> ANGANY GENETICS

<120> Producción comercial del alérgeno Amb A1 por expresión transitoria en plantas

<130> BFF140239

45 <160> 9

<170> Patent In versión 3.5

<210> 1

50 <211> 1254

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> ADNc que codifica la preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7)

<400> 1

ES 2 781 861 T3

tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtatTTTtac cttagccctt 60
 gtcactttgc tgcaacctgt togttctgcc gaagatctcc aggaaatctt accagttaac 120
 gaaacaagga ggctgacaac aagtggagca tacaacatta tagacgggtg ctggaggggc 180
 aaagccgatt gggcggaaaa ccgaaaagcg ttagccgatt gtgcccaagg ttttgggaag 240
 ggaacagtgg gcggaaaaga tggatgatata tacacggtca ccagtgagct agatgatgat 300
 gttgcaaatc caaaaagaag cactctccgg tttggtgccg cccaaaacag gcccttgtgg 360
 atcatttttg aaagagatat ggtgattcgt ttggataaag agatggtggt aacagtgcac 420
 aagaccatcg atggccgagg ggcgaaagtt gaaatcatta acgctggttt cacccttaat 480
 ggtgtcaaga atgtaatcat tcataacata aatatgcatg atgttaaagt gaatccagga 540
 ggcctgatta agtccaacga tggccagca gctccaagag ctggtagtga tggatgatgct 600
 ataagtattt ctggtagtct acaaatatgg atcgaccatt gttcgctcag taagtctgtt 660
 gatgggctgg tagatgcca gctcggcacc acacgcttaa ccgtttcaa cagcttattc 720
 acccaacacc agtttgtact attattcggg gctggtgacg aaaatattga agatagaggc 780
 atgctagcaa cggctcgttt caacacgttc actgataacg ttgaccaaag aatgcctaga 840
 tgtcggcatg ggtttttcca agtcgttaac aacaactatg ataaatgggg atcgatgcc 900
 atcggtggtg gcgcgtcccc aaccatactc agccaagggg acagattctg ccccccgat 960
 gaacgcagca agaaaaatgt cctaggaagg catggtgaag ccgcccagca gtcgatgaag 1020
 tggaaactgga gaacgaataa agacgtgctt gaaaatggtg ctatTTTTgt tgcacccggg 1080
 gtcgatccag tgctaacccc tgagcaaagc gcagggatga ttccagccga accaggagag 1140
 tccgctctaa gcctcactag tagtgctggt gtactctcat gccaaaccgg agcaccttgc 1200
 catcatcatc atcatcatga ttataaagat gatgatgata aagtttgagt cgac 1254

<210> 2
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ADNc optimizado para uso en *N. benthamiana*, que codifica la preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7)

10

<400> 2

ES 2 781 861 T3

tctagaggta ccatgggcat caagcactgc tgctacatcc tctacttcac cctcgcctc	60
gtcaccctcc tccagcccgt ccgctccgcc gaggacctcc aggagatcct ccccgtaac	120
gagacccgcc gcctcaccac ctccggcgcc tacaacatca tcgacggctg ctggcgcggc	180
aaggccgact gggccgagaa ccgcaaggcc ctccgccact gcgcccaggg ctccggcaag	240
ggcaccgtcg gcggcaagga cggcgacatc tacaccgtca cctccgagct cgacgacgac	300
gtcgccaacc ccaaggaggg caccctccgc ttcggcgccg cccagaaccg cccctctgg	360
atcatcttcg agcgcgacat ggtcatccgc ctcgacaagg agatggtcgt caactccgac	420
aagaccatcg acggccgcgg cgccaaggtc gagatcatca acgcccggctt caccctcaac	480
ggcgtcaaga acgtcatcat ccacaacatc aacatgcacg acgtcaaggc caacccccggc	540
ggcctcatca agtccaacga cggccccgcc gccccccgcg ccggctccga cggcgacgcc	600
atctccatct ccggctcctc ccagatctgg atcgaccact gctccctctc caagtccgtc	660
gatggcctcg tcgatgcaa gctcggcacc acccgctca ccgtctcaa ctccctcttc	720
accagcacc agttcgtcct cctcttcggc gccggcgacg agaacatcga ggaccgcggc	780
atgctcgcca ccgtcgctt caacaccttc accgacaacg ttgaccagcg catgccccgc	840
tgccgccacg gcttcttcca ggtcgtcaac aacaactacg acaagtgggg ctccctacgcc	900
atcggcggct ccgcctcccc caccatcctc tcccagggca accgcttctg cgcctccgac	960
gagcgtcca agaagaacgt cctcggccgc cacggcgagg ccgcccgcga gtccatgaag	1020
tggaactggc gcaccaacaa ggacgtcctc gagaacggcg ccatcttcgt cgcctccggc	1080
gttgaccccg tcctcaccac cgagcagtcc gccggcatga tccccgccga gcccgcgag	1140
tccgccctct ccctcacctc ctccgccggc gtcctctcct gccagcccgg cgcctccgac	1200
catcatcatc atcatcatga ttataaagat gatgatgata aagtttgagt cgac	1254

<210> 3
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ADNc armonizado que codifica la forma preproteína natural (de secuencia SEQ ID NO: 7)

10

<400> 3

ES 2 781 861 T3

tctagaggta ccatggggat taaacactgt tgttacatth tgtactttac tctcgcactc 60
 gtgaccctcc tccagcctgt gcgctccgca gaggatcttc aggagattct cccagttaat 120
 gagaccagga ggctgaccac ctccggagca tacaatatta tgcacggatg ctggagggga 180
 aaggcagatt gggccgagaa tccgaaggcc ctccgagatt gcgcacaagg ttttgccaag 240
 ggaaccgtgg gaggaaagga tggatgatc tacaccgtga cttccgagct cgatgatgat 300
 gttgcaaatc caaaggaggg aaccctccgc ttcggtgcag cacagaatag gccctctgg 360
 attatthttg agagggatat ggtgattcgg ctcgataagg agatgggtgg caattccgac 420
 aagactattg atggacggg agccaaggth gagattatta atgctggth cactctcaat 480
 ggtgthtaaga atgtcattat tcataatath aatathcacg atgthtaaggth gaatcctgga 540
 ggactgatta agtccaatga tggctctgca gctcctagag ctggthccga tggatgatgct 600
 atctccatth ccgthtctc ccagatctgg attgaccatt gthccctth caagthcctg 660
 gatggtctcg tcatgctaa gcttggaact accgcctca ctgthtcca thccctctc 720
 actcagcacc agthtctcct cctctcggc gctggtgacg agaathattga ggataggggth 780
 atgctcgcaa ccgthgctth caathactc accgataath ttgaccagag gatgctagth 840
 tgcgggcatg gatthtcca ggtgthtaat aathattacg athagthggg atctacgca 900
 atthgthgth ccgctcccc tactathctt tcccaggga athagthctg cgcacccgat 960
 gagcgtcca agaagaathg gctcggagg cacgthgag cagcagcaga gthcatgaag 1020
 tggaaathga ggaccaataa ggacgtgctc gagaathgth ctaththtthg tgcathcggga 1080
 gthgatcctg tgctactcc tgagcagthc gcaggaathga thcctgcaga gcctggagag 1140
 tccgctctc cctthactc ctccgctgth gthctthct gccagcccgg agcactthc 1200
 catcatcatc atcatcatga ttataaagath gatgatgata aagththgath cgac 1254

<210> 4
 <211> 606
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la subunidad beta

10

<400> 4

tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtatthtac cttagccctt 60
 gthcactthg tgcacactgt tctthctgcc gaagatctc aggaathctt accagthaac 120
 gaaacaagga ggctgacaac aagthgagca tacaathata tagacggthg ctggagggc 180
 aaagccgath gggcggaaaa ccgaaaagc thagccgath gthcccaagg tthtgggaag 240

ES 2 781 861 T3

ggaacagtgg gcggaaaaga tggatgata tacacgggtca ccagtgagct agatgatgat 300
 gttgcaaadc caaaagaagg cacactccgg tttggtgccg cccaaaacag gcccttggg 360
 atcatttttg aaagagatat ggtgattcgt ttggataaag agatggtggt aaacagtgac 420
 aagaccatcg atggccgagg ggcgaaagt gaaatcatta acgctggttt cacccttaat 480
 ggtgtcaaga atgtaatcat tcataacata aatatgcatg atgttaaagt gaatccagga 540
 ggcctgatta agcatcatca tcatcatcat gattataaag atgatgatga taaagtttga 600
 gtcgac 606

5 <210> 5
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ADNc nativo/optimizado/armonizado que codifica la subunidad alfa
 <400> 5

tctagaggta ccatggggat caaacactgt tgttacatct tgtattttac cttagccctt 60
 gtcactttgc tgcaacctgt tcgttctaac gatggtccag cagctccaag agctggtagt 120
 gatggtgatg ctataagtat ttctggtagt tcacaaatat ggatcgacca ttgttcgctc 180
 agtaagtctg ttgatgggct ggtagatgcc aagctcggca ccacacgctt aaccgtttcc 240
 aacagcttat tcaccaaca ccagtttgta ctattattcg gggctggtga cgaaaatatt 300
 gaagatagag gcatgctagc aacggtcgtt ttcaacacgt tcaactgataa cgttgaccaa 360
 agaatgccta gatgtcggca tgggtttttc caagtcgtta acaacaacta tgataaatgg 420
 ggatcgtatg ccatcgggtg tagcgcgtcc ccaaccatac tcagccaagg gaacagattc 480
 tgcgcccccg atgaacgcag caagaaaaat gtcctaggaa ggcatggtga agccgccgca 540
 gagtcgatga agtggaactg gagaacgaat aaagacgtgc ttgaaaatgg tgctatTTTT 600
 gttgcatccg gggtcgatcc agtgctaacc cctgagcaaa gcgcaggat gattccagcc 660
 gaaccaggag agtccgctct aagcctcact agtagtgctg gtgtactctc atgccaaccc 720
 ggagcacctt gccatcatca tcatcatcat gattataaag atgatgatga taaagtttga 780
 gtcgac 786

15 <210> 6
 <211 > 80
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> propéptido Der p1
 <400> 6

ES 2 781 861 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> 7
 <211> 417
 5 <212> PRT
 <213> *Ambrosia artemisiifolia*
 <400> 7

ES 2 781 861 T3

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

ES 2 781 861 T3

Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe Thr Leu Asn
145 150 155 160

Gly Val Lys Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His Asp Val Lys
165 170 175

Val Asn Pro Gly Gly Leu Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro Ala Ala Pro
180 185 190

Arg Ala Gly Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gln
195 200 205

Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Val Asp Gly Leu Val
210 215 220

Asp Ala Lys Leu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser Asn Ser Leu Phe
225 230 235 240

Thr Gln His Gln Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly Asp Glu Asn Ile
245 250 255

Glu Asp Arg Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Thr Phe Thr Asp
260 265 270

Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His Gly Phe Phe Gln Val
275 280 285

Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr Ala Ile Gly Gly Ser
290 295 300

Ala Ser Pro Thr Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe Cys Ala Pro Asp
305 310 315 320

Glu Arg Ser Lys Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly Glu Ala Ala Ala
325 330 335

Glu Ser Met Lys Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp Val Leu Glu Asn
340 345 350

Gly Ala Ile Phe Val Ala Ser Gly Val Asp Pro Val Leu Thr Pro Glu
355 360 365

Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ser Ala Leu Ser
370 375 380

Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Gln Pro Gly Ala Pro Cys
385 390 395 400

ES 2 781 861 T3

His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val Val
 405 410 415

Asp

<210> 8
 <211> 201
 5 <212> PRT
 <213> *Ambrosia artemisiifolia*
 <400> 8

Ser Arg Gly Thr Met Gly Ile Lys His Cys Cys Tyr Ile Leu Tyr Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Pro Val Arg Ser Ala Glu Asp
 20 25 30

Leu Gln Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu Thr Thr Ser
 35 40 45

Gly Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Gly Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp
 50 55 60

Ala Glu Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly Phe Gly Lys
 65 70 75 80

Gly Thr Val Gly Gly Lys Asp Gly Asp Ile Tyr Thr Val Thr Ser Glu
 85 90 95

Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe Gly
 100 105 110

Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu Arg Asp Met Val
 115 120 125

Ile Arg Leu Asp Lys Glu Met Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp
 130 135 140

Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe Thr Leu Asn
 145 150 155 160

Gly Val Lys Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His Asp Val Lys
 165 170 175

Val Asn Pro Gly Gly Leu Ile Lys His His His His His His Asp Tyr
 180 185 190

10

ES 2 781 861 T3

Lys Asp Asp Asp Asp Lys Val Val Asp
 195 200

5 <210> 9
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Ambrosia artemisiifolia*
 <400> 9

Ser Arg Gly Thr Met Gly Ile Lys His Cys Cys Tyr Ile Leu Tyr Phe
 1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Pro Val Arg Ser Asn Asp Gly
 20 25 30

Pro Ala Ala Pro Arg Ala Gly Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser
 35 40 45

Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Val
 50 55 60

Asp Gly Leu Val Asp Ala Lys Leu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Phe Thr Gln His Gln Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly
 85 90 95

Asp Glu Asn Ile Glu Asp Arg Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn
 100 105 110

Thr Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His Gly
 115 120 125

Phe Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr Ala
 130 135 140

Ile Gly Gly Ser Ala Ser Pro Thr Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe
 145 150 155 160

Cys Ala Pro Asp Glu Arg Ser Lys Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly
 165 170 175

Glu Ala Ala Ala Glu Ser Met Lys Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp
 180 185 190

Val Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val Ala Ser Gly Val Asp Pro Val
 195 200 205

ES 2 781 861 T3

Leu Thr Pro Glu Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu
210 215 220

Ser Ala Leu Ser Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Gln Pro
225 230 235 240

Gly Ala Pro Cys His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
245 250 255

Asp Lys Val Val Asp
260

REIVINDICACIONES

1. Célula vegetal que comprende una molécula de ADN que comprende al menos una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa elegida entre Amb a 1, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1, y los homólogos de Amb a 1, unida funcionalmente a un promotor fuerte, en donde dicha molécula de ADN no está integrada en el genoma de la célula vegetal.
2. Célula vegetal según la reivindicación 1, en donde la pectato liasa se elige entre Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1 y las proteínas de la familia de las Asteráceas que tienen al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1.
3. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la pectato liasa se elige entre Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1 y las proteínas de *Artemisia vulgaris*, *Ambrosia psilostachya* o *Ambrosia trifida*, que tienen al menos un 57 % de identidad, preferentemente al menos 60 % de identidad, preferentemente al menos 64 % de identidad, con una de las isoformas de Amb a 1.
4. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga comprende una secuencia que codifica el péptido señal, una secuencia que codifica el propéptido y una secuencia que codifica la pectato liasa madura.
5. Célula vegetal según la reivindicación 4, en donde:
- el péptido señal se elige entre el péptido señal natural de la pectato liasa y el péptido señal de la quitinasa de tabaco; y
 - el propéptido se elige entre los propéptidos naturales de las pectato liasas y los propéptidos de las peptidasas C1A.
6. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga comprende además una secuencia de péptido de direccionamiento intracelular que se dirige a la pectato liasa en forma soluble o membranaria hacia el retículo endoplasmático o los diversos compartimentos constituyentes del sistema endomembranario de secreción de la célula vegetal.
7. Célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un vector de expresión que comprende:
- elementos del ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriana y un gen de resistencia a un antibiótico;
 - la secuencia nucleotídica heteróloga como se define en una de las reivindicaciones precedentes;
 - un casete de expresión que permite la expresión de un inhibidor de silenciamiento, preferentemente p19; y
 - elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, como secuencias de terminación/poliadenilación, preferentemente la secuencia Tnos.
8. Planta que comprende al menos una célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Método de producción de una pectato liasa elegida entre Amb a 1, la subunidad alfa de Amb a 1, la subunidad beta de Amb a 1 y los homólogos de Amb a 1, que comprende expresar dicha pectato liasa en una célula vegetal según una de las reivindicaciones 1 a 7, o en una planta según la reivindicación 8.
10. Método de producción de una pectato liasa según la reivindicación 9, que comprende las siguientes etapas:
- a) transformación de agrobacterias con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una preproteína de una pectato liasa unida de manera funcional a un promotor fuerte; y
 - b) transfección de la célula vegetal o de la planta con las agrobacterias obtenidas en la etapa a).
11. Método de producción de una pectato liasa según la reivindicación 10, en donde las agrobacterias utilizadas en la etapa a) se eligen entre las cepas LBA4404, GV3101, EHA 101/105 y C58, y en donde la transfección de la etapa b) comprende preferentemente las siguientes etapas:
- b1) cultivar la célula vegetal o la planta, en aeroponía o hidroponía, y bajo iluminación LED, 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); y

b3) volver a cultivar la célula vegetal o la planta obtenida en b2), típicamente de 3 a 6 días.

12. Método de producción de una pectato liasa según la reivindicación 10 u 11, que comprende además una etapa c) de extracción de la pectato liasa producida, dicha etapa c) comprendiendo las siguientes etapas:

- 5
- infiltración al vacío de la célula u hojas de la planta (es decir, parte aérea) de la planta, en una solución enzimática que contiene una pectinasa o macerozima, que no presenta actividad proteolítica,
 - eliminación de la célula vegetal infiltrada u hojas infiltradas de la planta e incubación, en una solución enzimática de pectinasa o macerozima, durante un periodo entre 2h30 y 5 h, a una temperatura entre 24 °C y 30 °C, después

10

 - agitación de la mezcla obtenida entre 20 y 30 rpm a temperatura ambiente durante un periodo entre 30 minutos y 2 h,
 - filtración, luego opcionalmente centrifugación del digestato obtenido, y

recuperación del sobrenadante.

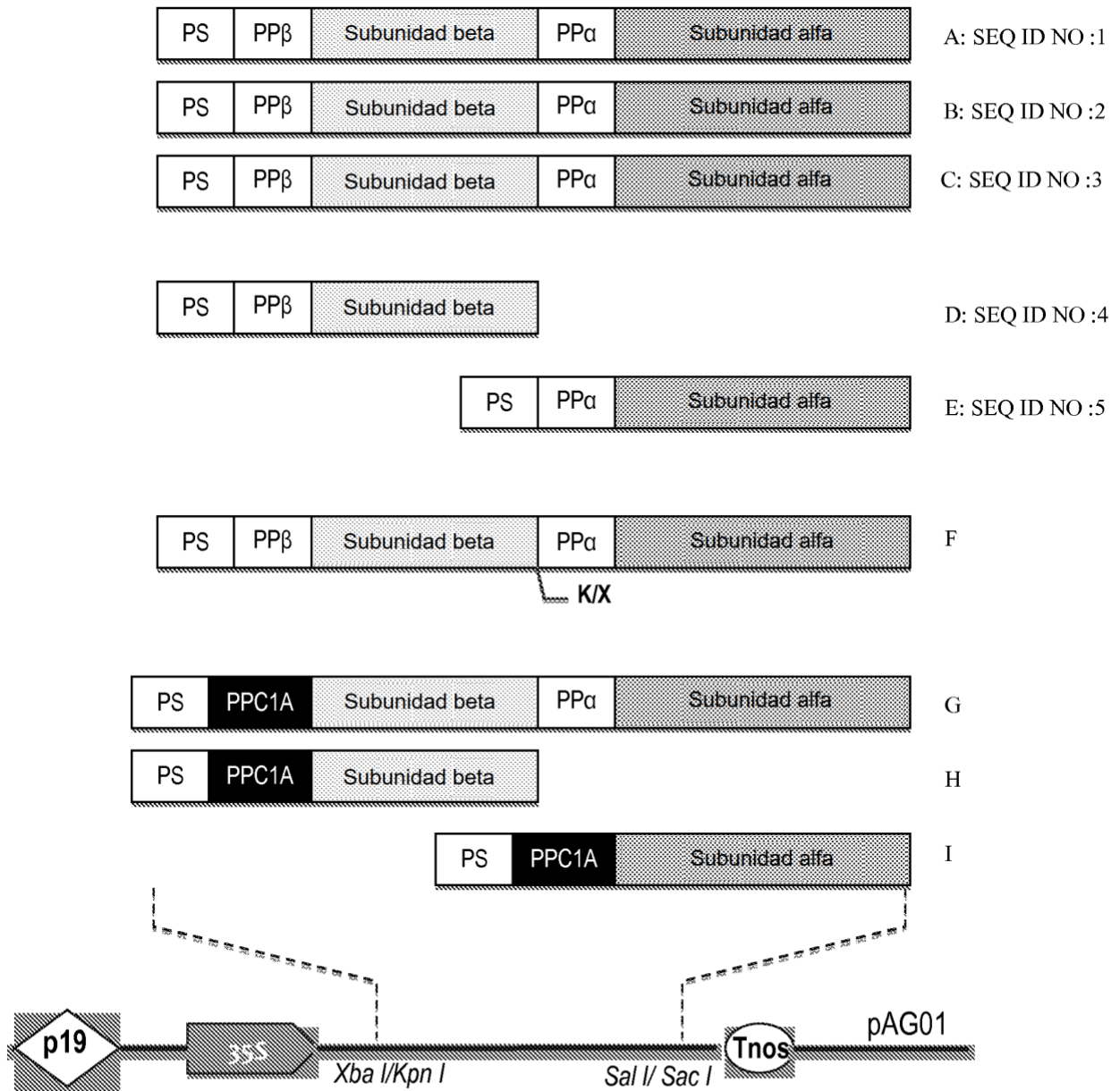


Figura 1

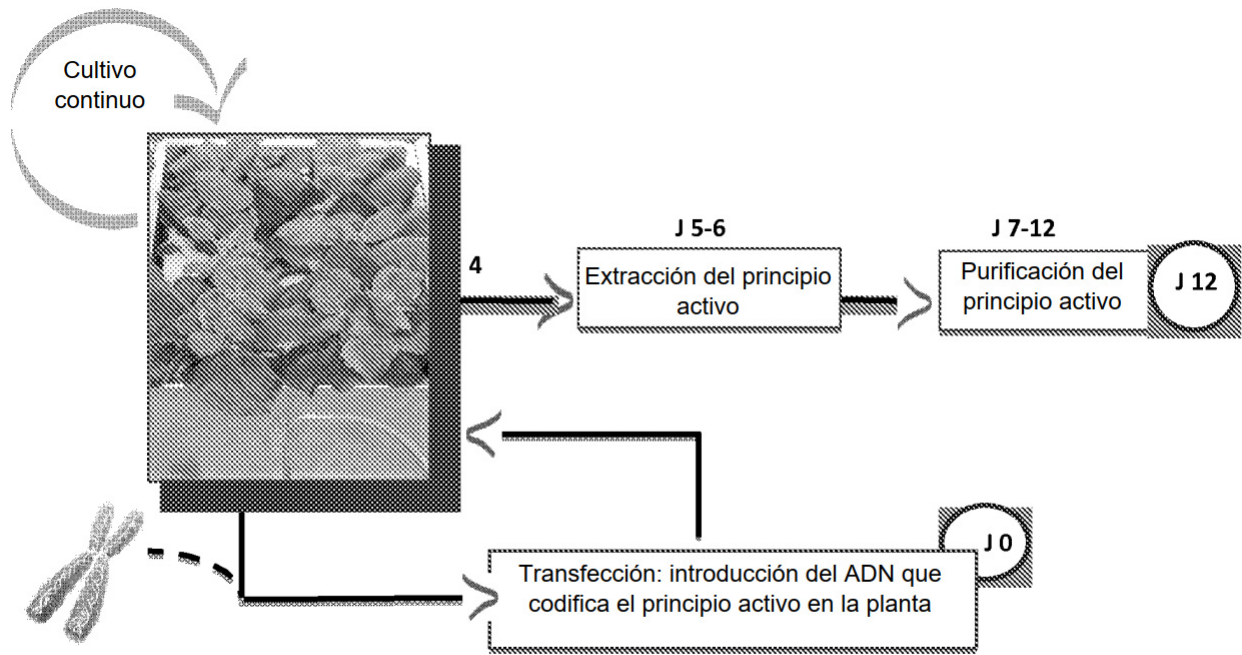


Figura 2

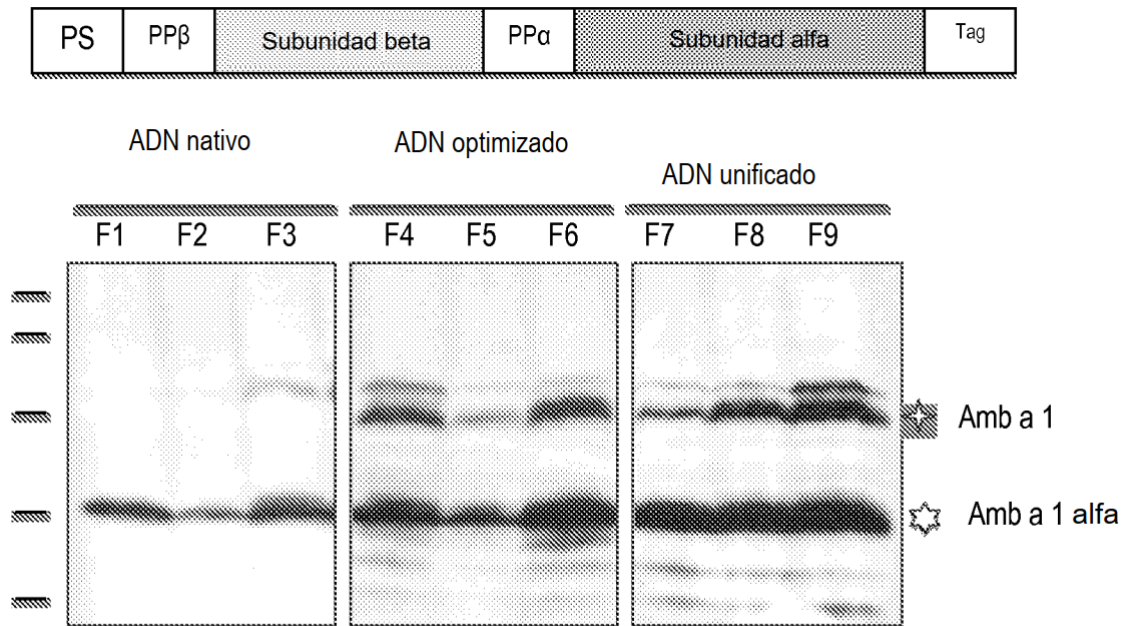


Figura 3

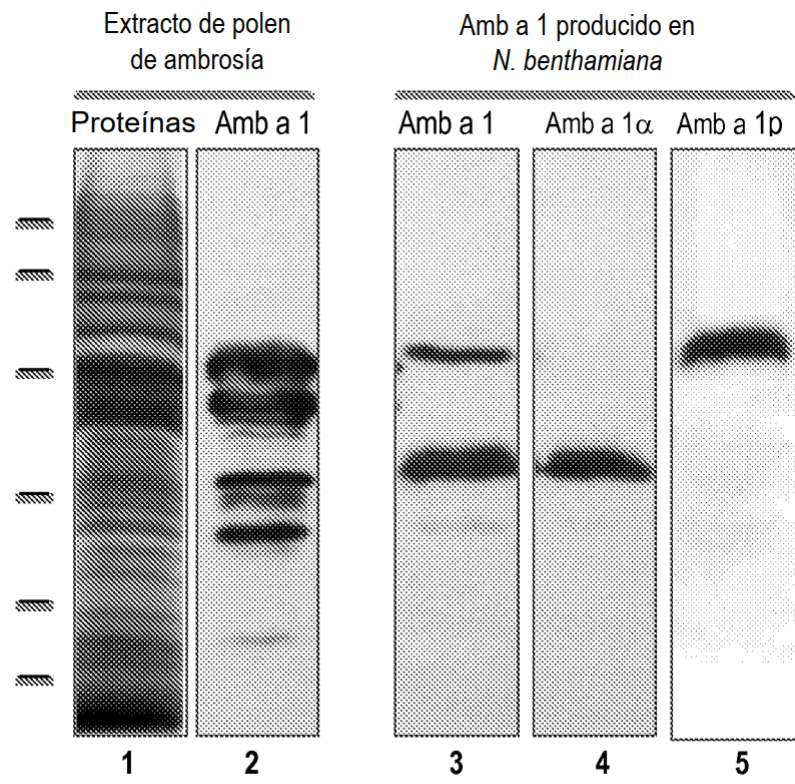


Figura 4

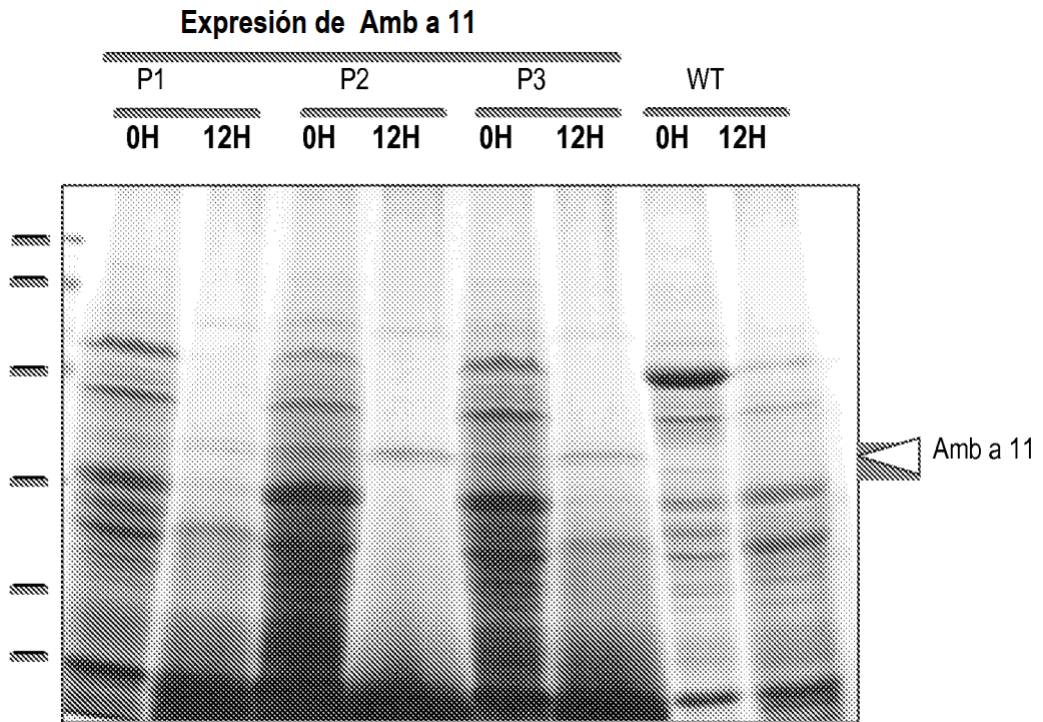


Figura 5