

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 784**

21 Número de solicitud: 201431378

51 Int. Cl.:

C12N 15/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/14 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

22.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2015

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.09.2016

Fecha de la concesión:

14.11.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.11.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ COSTAS, José Manuel ;
BARREIRO PIÑEIRO, Natalia y
BENAVENTE MARTÍNEZ, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Proteína muNS capaz de formar inclusiones en el retículo endoplasmático, métodos de uso y usos de la misma**

57 Resumen:

Proteína muNS capaz de formar inclusiones en el retículo endoplasmático, métodos de uso y usos de la misma.

La invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido basado en la región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus capaz de formar inclusiones en el retículo endoplasmático, así como con dicho polipéptido. Asimismo, la invención se relaciona con un método de purificación y un método para la detección de la interacción entre dos polipéptidos, basado en la capacidad de algunas regiones de la proteína muNS de los Orthoreovirus de incorporarse a las inclusiones, junto con un péptido de interés.

ES 2 548 784 B2

DESCRIPCIÓN**PROTEÍNA muNS CAPAZ DE FORMAR INCLUSIONES EN EL RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO, MÉTODOS DE USO Y USOS DE LA MISMA**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido basado en la
región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus capaz de formar inclusiones en el
10 retículo endoplasmático, así como con dicho polipéptido. Asimismo, la invención se relaciona
con un método de purificación y un método para la detección de la interacción entre dos
polipéptidos, basado en la capacidad de algunas regiones de la proteína muNS de los
Orthoreovirus de incorporarse a las inclusiones, junto con un péptido de interés.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los reovirus aviares son miembros del género Orthoreovirus, uno de los 12 géneros de la
familia Reoviridae. Estos virus son importantes patógenos de aves y causan importantes
pérdidas económicas en la industria avícola. Los reovirus aviares son virus sin envoltura
20 lipídica que se replican en el citoplasma de las células infectadas y poseen un genoma de 10
segmentos de ARN de doble cadena rodeados por una doble cubierta proteica concéntrica de
85 nm de diámetro. Los segmentos genómicos están divididos en tres clases en función de
su movilidad electroforética, tres de la clase L (large o grande), otros tres de la M (medium o
mediana) y cuatro de la S (small o pequeña). Con excepción del segmento S1, que es
25 tricistrónico, todos los demás genes son monocistrónicos. Los segmentos genómicos se
transcriben por medio de una polimerasa dependiente de ARN para producir ARN
mensajeros (ARNm) con una secuencia nucleotídica idéntica a la de la cadena positiva del
segmento de ARN de doble cadena. Los ARNm virales ejercen una doble función en las
células infectadas: programan la síntesis de proteínas virales en los ribosomas, y sirven como
30 molde para la síntesis de las cadenas negativas de los segmentos genómicos.

El genoma del reovirus aviar codifica al menos 12 proteínas, de las cuales 8 son
estructurales (que se incorporan al virión), y 4 no estructurales, que se expresan en células
infectadas, pero no forman parte de los reoviriones maduros. Las proteínas codificadas por
35 los genes de la clase L se denominan lambda (λ), las codificadas por los de la clase M, mu
(μ) y los codificados por los de la clase S, sigma (σ). A las proteínas estructurales de cada

clase se les ha asignado un sufijo alfabético (λ A, λ B, etc.) según su movilidad electroforética. El reovirión contiene al menos 10 proteínas estructurales diferentes, 8 de las cuales (λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, σ A, σ B y σ C) son productos primarios de traducción de sus mRNAs, mientras que las otras dos, μ BN y μ BC, se originan por procesamiento proteolítico del precursor μ B.

- 5 Además de las proteínas estructurales, los reovirus aviares expresan cuatro proteínas no estructurales. Así, los genes M3 y S4 expresan dos proteínas no estructurales mayoritarias, denominadas μ NS y σ NS, respectivamente mientras que p10 y p17 están codificadas por los dos primeros cistrones del gen S1.
- 10 Los reovirus aviares se replican en inclusiones globulares citoplasmáticas denominadas factorías virales o viroplasmas, las cuales contienen proteínas virales estructurales y no estructurales, sin embargo carecen de membranas y organelas celulares. La expresión individual de proteínas virales en células transfectadas reveló que la proteína no estructural μ uNS es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa
- 15 en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al.*, 2004; citado *ad supra*). Esto, y el hecho de que las inclusiones globulares citoplasmáticas formadas por μ uNS en células transfectadas son muy similares en apariencia a las factorías virales de células infectadas, sugieren que μ uNS es el factor viral mínimo requerido para la formación de factorías virales en células infectadas con el reovirus aviar. El análisis de células transfectadas que co-
- 20 expresan μ uNS y otras proteínas virales reveló que μ uNS juega un papel importante en estadios tempranos de la morfogénesis del virus y que el reclutamiento de proteínas del reovirus aviar a las factorías virales es un proceso selectivo y controlado temporalmente.

- 25 Los reovirus de mamífero también se replican en inclusiones globulares citoplasmáticas. De la misma manera que con los reovirus aviares, la proteína μ uNS no estructural se ha visto implicada en la formación de las inclusiones, así como en el reclutamiento de otros componentes a las inclusiones para posibles implicaciones en la replicación del genoma y en el ensamblaje de las partículas.

- 30 A pesar de que las proteínas μ uNS de reovirus aviar y de mamífero muestran únicamente un 28,3% de identidad de secuencia, ambas contienen dos regiones en su extremo C-terminal con una alta probabilidad de estructura "coiled-coil". Por otro lado, la proteína de mamífero es 86 aminoácidos más larga y es capaz de hacer más contactos primarios con otras proteínas virales estructurales y no estructurales que la proteína aviar. Aunque las proteínas μ uNS de
- 35 todas las cepas de reovirus mamíferos (MRV) producen inclusiones globulares cuando se expresan en células transfectadas, la mayoría de las cepas producen factorías virales con

morfología filamentosa durante la infección. El fenotipo filamentoso de las factorías de reovirus de mamífero se ha atribuido a la proteína mu2, debido a su capacidad de asociarse tanto con microtúbulos y con muNS de reovirus mamífero. La expresión de versiones truncadas de muNS de MRV en células transfectadas reveló que el segmento entre los
 5 residuos 471-721 es la región más pequeña de muNS necesaria y suficiente para formar inclusiones. Se predice que esta región contiene dos segmentos de secuencias con alta probabilidad de formar estructuras “coiled-coil”, que están unidas por una región, precedida por un tramo de aproximadamente 50 residuos y seguido por una cola C-terminal.

10 Existen en la actualidad varios sistemas diseñados para la determinación de la interacción entre proteínas, de los cuales el sistema del doble híbrido es el más popular. Este sistema se basa en la expresión de dos proteínas de fusión: una en la que la proteína X está fusionada al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GCN4; y otra en la que la proteína Y está fusionada al dominio de activación de transcripción del mismo factor GCN4. Si X e Y
 15 interaccionan, se supone que reconstituyen un GCN4 funcional en la célula que activará la transcripción de un gen reportero. Entre los problemas más obvios de este sistema se incluyen: i) aunque X e Y interaccionen, la arquitectura de dicha interacción muchas veces no permite la reconstrucción de un GCN4 funcional; ii) las fusiones pueden alterar las estructuras de los diferentes dominios de GCN4 o de los dominios de interacción de las
 20 proteínas problema.

Se ha descrito un nuevo sistema que utiliza la formación de inclusiones por la proteína muNS de los reovirus de mamífero como una plataforma para detectar interacciones entre proteínas *in vivo* en células de mamífero y que ha sido adaptado también para usarse en levaduras. En
 25 este sistema, la proteína problema se fusiona con la zona C-terminal de muNS para que la fusión genere inclusiones citoplasmáticas y atraiga a ellas al ligando de la proteína problema. En el sistema de levaduras, estos autores demuestran que su sistema es superior al del doble híbrido en el número y tipo de interacciones detectadas, al menos con las proteínas ensayadas en dicho trabajo. Sin embargo, este sistema presenta varios problemas, entre los
 30 que se destacan: i) ciertas proteínas pueden plegarse incorrectamente al fusionarlas con la muNS-Mi y perder capacidad de interacción con sus ligandos; ii) algunas proteínas pueden interferir con la capacidad de formación de inclusiones de muNS-Mi y bien, no formarlas o generar agregados intracelulares, viéndose enormemente alterada la detección de interacciones; iii) la localización intracelular de la proteína problema o del ligando puede no
 35 ser la adecuada para poder ser detectada en inclusiones citoplasmáticas.

El documento WO 2011/098652 describe un sistema que emplea la formación de inclusiones por la proteína muNS de Orthoreovirus como plataforma para la purificación de proteínas y para la detección de interacciones entre proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta plataforma está basada en la mínima región de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar capaz de formar inclusiones, la cual recluta a las mismas una etiqueta peptídica y a las proteínas unidas a la misma. La etiqueta peptídica comprende la mínima región de la proteína muNS de un Orthoreovirus con capacidad de ser incorporada a las inclusiones formadas por la proteína muNS.

No obstante, ninguna de las aproximaciones disponibles en el estado de la técnica contempla la purificación de proteínas modificadas post-traduccionalmente en el retículo endoplasmático, ya que las interacciones proteína-inclusiones ocurren en el citoplasma. Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de desarrollar un sistema que presente ventajas con respecto a los sistemas existentes, en el que por ejemplo, la proteína fusionada a las inclusiones no altere la formación de dichas inclusiones, que la proteína fusionada mantenga su actividad y que se puedan incluir múltiples epítomos en dichas inclusiones.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido, en adelante primer polinucleótido de la invención, que comprende

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido codificado por el polinucleótido de la invención y con una célula que comprende dicho primer polinucleótido de la invención o dicho polipéptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica una proteína de fusión, en adelante segundo polinucleótido de la invención, que comprende:

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y

(c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión codificada por el segundo polinucleótido de la invención y con una célula que comprende dicho segundo polinucleótido de la invención o dicha proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante kit de la invención, que comprende:

(a) un componente A seleccionado del grupo de:

- el primer polinucleótido de la invención, y
- una célula que expresa el primer polinucleótido de la invención; y

(b) un componente B que comprende el segundo polinucleótido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de purificación de un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en adelante método de purificación de inclusiones de la invención, en donde dicho método comprende

(i) expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima, y

(ii) purificar las inclusiones formadas en la etapa (i).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de purificación de una proteína de fusión que comprende un polipéptido de interés y la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a las inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en adelante primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención, en donde dicho método comprende

(i) expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido que comprende

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente,

en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima,

(ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido, en donde dicho segundo polinucleótido es un polinucleótido codifica una proteína de fusión que comprende:

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y
- (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente,

en condiciones adecuadas para la translocación de la proteína de fusión a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones formadas en la etapa (i), y

(iii) purificar los complejos que comprenden las inclusiones formadas en la etapa (i) y las proteínas de fusión producidas en la etapa (ii),

en donde las etapas (i) y (ii) se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la purificación de una proteína de fusión que comprende

(a) un polipéptido de interés, y

(b) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en adelante segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención, en donde dicho método comprende:

(i) poner en contacto dicha composición con inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones;

(ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la purificación de una proteína de fusión que comprende

(a) un polipéptido de interés, y

(b) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en adelante tercer método de purificación de proteínas de fusión de la invención, en donde dicho método comprende:

(i) poner en contacto dicha composición con un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho polipéptido con capacidad de formar inclusiones se encuentra en forma soluble, y

en donde dicha puesta en contacto se realiza en presencia de una concentración de cationes divalentes adecuada para la formación de inclusiones a partir del polipéptido

con capacidad de formar inclusiones y del reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones,

- (ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i).

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante primer método para la detección de interacciones de la invención, que comprende:

- (i) expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
- 10 (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- 15 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, y
- en donde el polipéptido de interés es el primer polipéptido, y
- mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;
- 20 (ii) expresar en dicha célula un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y
- 25 (iii) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre el primer y segundo polipéptido,
- en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo en cualquier orden.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante segundo método para la detección de interacciones de la invención, que comprende:

- (i) expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido que comprende
- 35 (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- 5 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y
- mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;
- (ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:
- 10 (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- (b) un segundo componente que comprende dicho primer polipéptido, y
- (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones
- 15 formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,
- en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente
- en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones
- 20 formadas en la etapa (i);
- (iii) expresar en dicha célula un tercer polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se
- 25 exprese dicho segundo polipéptido y
- (iv) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i) y la proteína de fusión expresada en la etapa (ii), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre dicho primer y segundo polipéptido,
- 30 en donde las etapas (i), (ii) y (iii) se llevan a cabo en cualquier orden.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante tercer método para la detección de interacciones de la invención, en donde dicho método comprende,

- 35 (i) poner en contacto inclusiones formadas por una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de

formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación y el primer polipéptido con el segundo polipéptido y

(ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,

en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante “cuarto método para la detección de interacciones de la invención”, que comprende

(i) poner en contacto

(a) inclusiones formadas por una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación,

(b) una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y el primer polipéptido y

(c) el segundo polipéptido y

(ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,

en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso, en adelante uso *in vitro* de la invención, de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,

(b) un segundo componente que comprende dicho primer polipéptido, y

(c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente

para incorporar el segundo componente del polipéptido codificado por dicho polinucleótido a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

5 (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

(b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un

15 Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y

(c) un tercer componente que comprende un polipéptido de interés

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y tercer componentes,

20 para su uso en medicina, en adelante primer uso terapéutico de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,

25 (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y

(c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

30 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componentes,

para su uso en medicina, en adelante segundo uso terapéutico de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

35

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

(b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y

(c) un tercer componente que comprende un polipéptido de interés

5 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente y tercer componentes,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés, en adelante tercer uso terapéutico de la invención.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,

(b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y

15 (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo

20 y al tercer componente,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés, en adelante cuarto uso terapéutico de la invención.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Detección por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas muNS-Mi y Sec-muNS-Mi.

30 Figura 2: Análisis del estado de glicosilación de las proteínas muNS-Mi y Sec-muNS-Mi.

Figura 3: Análisis del estado de glicosilación de las proteínas Sec-muNS-Mi y Sec-muNS-Mi*.

Figura 4: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión y capacidad de formación de
35 inclusiones de las proteínas muNS-Mi y muNS-Mi*.

Figura 5: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas muNS-Mi y muNS-Mi* y su capacidad para reclutar a GFP-IC o GFP-IC*.

Figura 6: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas Sec-muNS-Mi y Sec-muNS-Mi* y su capacidad para formar inclusiones en el interior del RE.

Figura 7: Captura de VSV-IC* en microesferas en el interior del RE. A. Esquema de la composición en dominios de la glicoproteína G de VSV y de la construcción VSV-IC*. B. Inmunofluorescencia de células DF-1 co-transfectadas con los plásmidos que dirigen la expresión de las proteínas sec-muNS-Mi* y VSV-IC*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado una plataforma basada en el direccionamiento de la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus con capacidad de formar inclusiones a la vía secretora, la cual permite la purificación de proteínas modificadas post-traduccionalmente que estén fusionadas o que sean incorporadas a dichas inclusiones. Esta plataforma presenta además las siguientes ventajas con respecto a los sistemas existentes: la proteína fusionada o dirigida a las inclusiones no altera la formación de dichas inclusiones, la proteína fusionada o dirigida mantiene su actividad y se puedan incluir múltiples epítopos en dichas inclusiones.

Región mínima de la proteína muNS capaz de formar inclusiones en el retículo endoplasmático (RE)

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la región mínima de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar con la capacidad de la proteína completa de formar inclusiones, correspondiente a los residuos 448 a 635, conserva dicha capacidad cuando se dirige dicha región a la vía secretora. Esto se demuestra en el Ejemplo 1, donde se exhibe la capacidad de esta región de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático (RE).

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, en adelante "primer polinucleótido de la invención", que codifica un polipéptido que comprende

(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

(b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.

El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiere a un polímero formado por un número variable de monómeros en donde los monómeros son nucleótidos, incluyendo tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos. Los polinucleótidos incluyen monómeros modificados mediante metilación o así como formas no modificadas. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente invención e incluyen mRNA, cDNA y polinucleótidos recombinantes.

El término "polipéptido", usado aquí indistintamente con proteína, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o por puentes disulfuro.

Según la presente invención, el primer polinucleótido de la invención comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora.

El término "péptido señal de la vía secretora", usado aquí indistintamente con "secuencia señal" o "péptido señal" o "péptido señal de localización", se refiere a un péptido corto (5-30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo N-terminal que dirige el transporte de proteínas destinadas hacia la vía secretora, ya sean proteínas que residen en ciertos orgánulos (RE, complejo de Golgi o endosomas), proteínas secretadas por la célula o proteínas insertadas en la membrana celular. El péptido señal dirige la translocación al RE de la proteína a la cual va unido. Durante o después de la translocación, el péptido señal es escindido por una peptidasa señal, generando un péptido señal libre y una proteína madura.

Ejemplos no limitativos de péptidos señal de la vía secretora incluyen los péptidos señal que aparecen en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas, secuencias señal de la cadena invariante o de las proteínas Lamp1, Tapasin, Erp57, Calreticulin, Calnexin. En una realización particular, la secuencia de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en:

- la secuencia MGWSLILLFLVAVATGVHSQ (SEQ ID NO: 1);

- la secuencia MMSFVSLLLVGILFWATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 2);
- el péptido señal de PTH1R humana (MGTARIAPGLALLCCPVLSSAYAL, SEQ ID NO: 3);
- secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana (MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAK, SEQ ID NO: 4)
- el péptido señal de mGluR5 humana (MVLLILSVLLLKEDVRGSA, SEQ ID NO: 5);
- el péptido señal de GABA_{B2}R humana (MASPRSSGQPGPPPPPPPPARLLLLLLLPLLLPLAPG, SEQ ID NO: 6);
- el péptido señal de la calreticulina humana (MLLSVPLLLGLLGLAVA, SEQ ID NO: 7);
- y
- el péptido señal de la cadena pesada de IgY2b humana, (MGWSCIILFLVATATGKGLTVAGLRSGHIYG, SEQ ID NO: 8).

En una realización preferida, el péptido señal de la vía secretora comprende la secuencia MGWSLILLFLVAVATGVHSQ (SEQ ID NO: 1).

El primer polinucleótido de la invención comprende un primer componente que se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.

Según la presente invención, el primer polinucleótido de la invención comprende un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El término “proteína muNS de un Orthoreovirus” o “proteína μNS de un Orthoreovirus”, según se usa en la presente invención, se refiere a una de las proteínas no estructurales codificada por el gen M3 del reovirus u Orthoreovirus y es la única proteína del Orthoreovirus capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales.

Proteínas muNS de diferentes especies son adecuadas para los propósitos de la presente invención. Así, en una forma de realización particular, la proteína muNS de un Orthoreovirus se selecciona del grupo que consiste en la proteína muNS de Orthoreovirus aviar y la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero.

En una realización preferida, la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus aviar. Se trata de una proteína de 635 aminoácidos definida por el número de

acceso AY608700 (SEQ ID NO: 9) en la base de datos GenBank, a fecha de 29 de agosto de 2014. El término “Orthoreovirus aviar” o “reovirus aviar”, según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus Reoviridae y en concreto al grupo dentro de la especie que infecta aves. Presentan genomas dsRNA y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

En otra realización preferida, la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero. Se trata de una proteína de 721 aminoácidos definida por el número de acceso ABP48918 (SEQ ID NO: 10) en la base de datos GenBank, a fecha de 29 de agosto de 2014. El término “Orthoreovirus mamífero” o “reovirus de mamífero”, según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus Reoviridae y en concreto al grupo dentro de la especie que infecta mamíferos. Presentan genomas dsRNA y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

El término “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula” o “muNS-Mi”, según se usa en la presente invención, se refiere a la mínima región de la proteína muNS de un Orthoreovirus que conserva la capacidad de la proteína completa de formar inclusiones.

En la forma de realización preferida en la que la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, la región mínima de dicha proteína muNS que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprende la región correspondiente a los residuos 448 a 635 (SEQ ID NO: 11). En una realización aún más preferida, la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar comprende la región correspondiente a los residuos 448 a 635 (SEQ ID NO: 11) y hasta 635 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 634 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 600 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 550 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 500 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 450 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 400 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 350 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 300 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 250 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 200 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 195 aminoácidos

consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o hasta 190 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, o 188 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar.

- 5 En la forma de realización preferida en la que la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, la región mínima de dicha proteína muNS que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprende la región correspondiente a los residuos 471 a 721 (SEQ ID NO: 12). En una realización aún más preferida, la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero comprende
- 10 la región correspondiente a los residuos 471 a 721 (SEQ ID NO: 12) y hasta 721 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 720 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 700 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 650 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 600 aminoácidos
- 15 consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 550 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 500 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 450 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 400 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 350 aminoácidos
- 20 consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 300 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 275 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 270 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 265 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 260 aminoácidos
- 25 consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o hasta 255 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, o 251 aminoácidos consecutivos de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero.

El término “inclusión”, según se usa en la presente invención, se refiere a agregados

30 nucleares o citoplasmáticos, normalmente de proteínas. En concreto, la proteína que forma las inclusiones en el género Orthoreovirus es la proteína muNS o μ NS, que es una de las proteínas no estructurales codificada por el gen M3 y es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales.

35 Por “variante funcionalmente equivalente” de la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula

se entiende todos aquellos polipéptidos derivados de dicha región mínima de muNS mediante modificación, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las proteínas muNS mencionadas anteriormente. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de generar inclusiones en una célula.

Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de muNS arriba indicadas, y que mantienen la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215:403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc. Métodos adecuados para determinar la capacidad de muNS, de muNS-Mi o de la variante funcionalmente equivalente de muNS-Mi de generar inclusiones incluye, pero no se limita al método descrito en el Ejemplo 1 del documento WO 2011/098652 basado en la expresión de muNS o muNS-Mi y en la detección de las inclusiones por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra muNS, y que se incorpora aquí por referencia.

El polipéptido que comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, codificado por el primer polinucleótido de la invención se sintetiza en el citoplasma y se transloca en el RE mediante el péptido señal comprendido en dicho primer componente. La translocación del polipéptido conlleva una escisión del péptido señal. Una vez en el RE, el polipéptido puede ser modificado post-traduccionalmente, dependiendo de si el polipéptido contiene secuencias consenso para dichas modificaciones.

Los autores de la presente invención han demostrado que, sorprendentemente, el polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención genera inclusiones en el RE de manera particularmente más eficiente cuando el segundo componente del polipéptido no contiene N-glicosilaciones.

Por lo tanto, en una realización particular, el segundo componente carece de secuencias consenso de N-glicosilaciones. El término “secuencia consenso de N-glicosilación”, según se usa en la presente invención, se refiere a la secuencia compuesta por -Asn-X-Ser/Thr, en donde X no es prolina, que es la secuencia consenso más representativa, así como a secuencias consensos de N-glicosilación menos abundantes, tales como las secuencias -Asn-Gly-, -Asn-X-Cys y -Asn-X-Val.

En una realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.

En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 104 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 14.

En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 160 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 15.

En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde los aminoácidos en posición 104 y 160 no son restos de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 16.

Como será evidente para el experto en la materia, puede ser conveniente que el polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención contenga además una etiqueta para facilitar su purificación.

Por tanto, en otra realización particular, el primer polinucleótido de la invención codifica un polipéptido que comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.

El término “péptido para facilitar la purificación”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un péptido útil para el aislamiento o purificación del segundo componente del polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención, y que está unido al extremo C-terminal con respecto al primer componente. Así, dicho péptido es capaz de la unión de uno o más ligandos de una matriz de afinidad, tal como una cromatografía de afinidad. Un ejemplo de dicho péptido es la cola de histidinas (His-tag) que puede contener seis residuos de histidinas (His6 o H6), que se puede unir a una columna de níquel o cobalto con alta afinidad. Otros ejemplos de dichos péptidos incluyen, aunque no se limitan, Arg-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo capaz de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag (reconocido por un anticuerpo anti-c-myc), SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. El experto en la materia entenderá que los péptidos para facilitar la purificación también son útiles para detección del polipéptido al cual están unidos. Esto se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales, por ejemplo, técnicas basadas en anticuerpos que reconocen específicamente el péptido para facilitar la purificación.

El péptido para facilitar su purificación puede estar en posición N- ó C-terminal con respecto al segundo componente. En una realización preferida, el péptido para facilitar su purificación está en posición N-terminal con respecto al segundo componente. En otra realización preferida, el péptido para facilitar su purificación está en posición C-terminal con respecto al segundo componente.

El polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención puede contener, además, un polipéptido de interés.

En otra realización particular, el primer polinucleótido de la invención codifica un polipéptido que comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente.

El término “polipéptido de interés”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier polipéptido que se quiera incluir en el polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención en forma de una proteína de fusión. El término “proteína de fusión”, según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que comprenden dos o más regiones que proceden de proteínas distintas o heterólogas. En una realización

preferida, dicho polipéptido de interés puede ser un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental o un antígeno tumoral.

Antígenos virales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen antígenos del VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humanos, (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos) o proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como gB o derivados de los mismos), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de los mismos), virus de la varicela zóster (tales como gpl, II, III y IE63), o de un virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos de núcleo, E1, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, de virus de la rubeola (tales como proteínas EI y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humanos (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, eg LI, L2, EI, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células infectadas con virus influenza, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus), y similares.

Antígenos bacterianos adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen antígenos de *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (tales como adhesinas e invasinas de alto y de bajo peso molecular); antígenos de *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *Parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina de la tosferina o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD de 19kDa [Rv3763], PPD de 38kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli*

enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a la toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo

5 *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas del clostridium A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma);

15 *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la

20 ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana exterior poco comunes), antígenos de *T.*

25 *denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Toxoplasma spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDa, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3

30 (documento EP 366 412) y posibles proteínas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico neumolisina, y derivados detoxificados mutantes de los mismos); antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no clasificable (tales como

35 OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y

peptidos derivados de fimbrina, o variantes de múltiples copias o las proteínas de fusión de las mismas).

Antígenos fúngicos adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, componentes de antígeno fúngico de *Candida*; antígenos fúngicos de *Histoplasma* tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígeno fúngico de *Histoplasma*; de *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; antígenos fúngicos de criptococos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígeno fúngico de criptococos; antígenos fúngicos de coccidios tales como antígenos de esférula y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios; antígenos de *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; de *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*; y antígenos fúngicos de *Tinea* tales como tricoftina y otros componentes de antígeno fúngico de coccidios.

Antígenos protozoarios adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium spp.*, como *P. falciparum* y antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* (tales como RTS,S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*); así como antígenos de superficie de merozoitos, antígenos de superficie de esporozoitos, antígenos de circumsporoito, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno de estadio en sangre pñ, 55/RESA y otros componentes de antígenos de plasmoides; antígenos de *Toxoplasma* tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígeno de *Toxoplasma*; antígenos de esquistosoma tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de esquistosoma; el antígeno de *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; el antígeno de *Leishmania* y otros antígenos de *Leishmania* tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígeno de *Leishmania*; antígenos de *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; y antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígeno de *Trypanosoma*.

Alérgenos o antígenos medioambientales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y

del veneno), alérgenos de la caspa y el pelo de animales, y alérgenos de la comida. Alérgenos del polen importantes de árboles, césped y hierbas se originan a partir de órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales*, *Pinales* y *Platanaceae* incluyendo entre otros *abedul* (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alérgénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, pájaros, alérgenos de veneno incluyendo los que se originan de picaduras o mordeduras de insectos tales como los del orden taxonómico de *Hymenoptera* incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas y hormigas (superfamilia *Formicoidae*). Todavía otros antígenos alérgénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

Antígenos tumorales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, γ -catenina, pl2Ooctn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia

linfoblástica aguda (etv6, amll, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, a-catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p2lras), cáncer biliar (p2lras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p2lras), carcinoma de colon (p2lras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p2lras, gp100Pme1117), mieloma (familia MUC, p2lras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antígenicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítomos del VLTH-1).

El polipéptido de interés puede estar en posición N- ó C-terminal con respecto al segundo componente. En una realización preferida, el polipéptido de interés está en posición N-terminal con respecto al segundo componente. En otra realización preferida, el polipéptido de interés está en posición C-terminal con respecto al segundo componente.

Adicionalmente, los dos o más componentes de la proteína de fusión, como por ejemplo el polipéptido de interés y el segundo componente, pueden estar conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de los dos componentes. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en la proteína de fusión de la invención incluyen enteroquinasa (sitio de corte DDDDK; SEQ ID NO: 17), factor Xa (sitio de corte IEDGR; SEQ ID NO: 18), trombina (sitio de corte LVPRGS; SEQ ID NO: 19), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG; SEQ ID NO: 20), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP; SEQ ID NO: 35), inteínas y similares.

La presente invención también contempla el polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención, en adelante “primer

polipéptido de la invención". En otro aspecto, la invención contempla el polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención en el que se ha eliminado la secuencia señal.

Asimismo, la invención se relaciona con una célula que comprende el primer polinucleótido de la invención, así como con una célula que comprende el primer polipéptido de la invención, en adelante "primera célula de la invención".

La célula de la invención puede ser cualquier célula procariota o cualquier célula eucariota. En la presente invención puede usarse prácticamente cualquier tipo celular, tal como se muestra en los Ejemplos en los que se utilizaron células DF-1 (fibroblastos de pollo). Cualquier célula huésped que pueda ser transformada con el polinucleótido de la invención, o que pueda ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante que contenga el primer polinucleótido de la invención, por ejemplo células animales (tal como células de mamífero, células de aves, células de insecto, etc.), células de plantas, levaduras, bacterias etc. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia.

Regiones de la proteína muNS que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones formadas por muNS o por muNS-Mi en el RE

Los autores de la presente invención han identificado que las regiones de la proteína muNS de Orthoreovirus que determinan la capacidad de dicha proteína de incorporarse a las inclusiones de muNS que aparecen en células en las que se expresa dicha proteína son capaces de reclutar a las inclusiones formadas por muNS o por muNS-Mi dentro del RE, tal como se muestra en el Ejemplo 7.

Este hallazgo permite extender el uso de dichas regiones para "etiquetar" proteínas y provocar su integración en inclusiones generadas por muNS, muNS-Mi, o en sus respectivas fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP) para ayudar a su seguimiento, dentro del RE.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con polinucleótido que codifica una proteína de fusión, en adelante "segundo polinucleótido de la invención", que comprende:

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y

(c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente.

Los términos “polinucleótido”, “proteína de fusión”, “péptido señal de la vía secretora”, “polipéptido de interés”, “proteína muNS de un Orthoreovirus”, “mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula” e “inclusiones” ya han sido descritos en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y sus definiciones y realizaciones particulares se incorporan aquí por referencia.

Por “la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula”, según la presente invención, se entiende la mínima región de la proteína muNS de un Orthoreovirus que conserva la capacidad de la proteína completa de incorporarse a las inclusiones formadas por la proteína muNS de un Orthoreovirus o por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula.

Los polipéptidos que forman parte del tercer componente pueden corresponder a varios fragmentos de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar (381-448, 448-477 (Coil 1 ó C1), 477-542 (Intercoil) ó 539-605 (Coil 2 ó C2)) o a la secuencia correspondiente de la proteína muNS Orthoreovirus mamífero. Por lo tanto, en la forma de realización en la que la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, el tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma se selecciona del grupo formado por:

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21 o una variante funcionalmente equivalente de la misma;

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23 o una variante funcionalmente equivalente de la misma; y
- 5 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Por otra parte, en la forma de realización en la que la proteína muNS de Orthoreovirus es la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, el tercer componente que comprende la región

10 mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula se selecciona del grupo formado por:

- un polipéptido que comprende la secuencia correspondiente de la proteína
- 15 muNS del Orthoreovirus mamífero a la secuencia SEQ ID NO: 21 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- un polipéptido que comprende la secuencia correspondiente de la proteína
- 20 muNS del Orthoreovirus mamífero a la secuencia SEQ ID NO: 22 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- un polipéptido que comprende la secuencia correspondiente de la proteína
- 25 muNS del Orthoreovirus mamífero a la secuencia SEQ ID NO: 23 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, o una variante funcionalmente equivalente de la misma; y
- un polipéptido que comprende la secuencia correspondiente de la proteína
- 30 muNS del Orthoreovirus mamífero a la secuencia SEQ ID NO: 24 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Dichos fragmentos de la proteína muNS son capaces de dirigir al segundo componente esté unido o no al primer componente, es decir, al polipéptido de interés unido o no a la secuencia señal de la vía secretora, a las inclusiones, ya que interaccionan específicamente con otras proteínas muNS. Con el fin de determinar la secuencia correspondiente de la proteína muNS

35 del Orthoreovirus mamífero con respecto a dichos fragmentos de la proteína muNS del

Orthoreovirus aviar, se puede llevar a cabo un alineamiento entre la secuencia de la proteína muNS aviar y la secuencia de la proteína muNS de mamífero. Dicho alineamiento de secuencias puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Se pueden llevar a cabo alineamientos óptimos de secuencias, por ejemplo con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2:482), con el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 1970, 48:443), por búsqueda de similitud con el método de Pearson y Lipman, (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85:2444), por implementación computerizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al, eds. 1995 supplement).

Los polipéptidos que forman parte del tercer componente se pueden referir a variantes funcionalmente equivalentes de los fragmentos citados de la proteína muNS de un Orthoreovirus. Por “variante funcionalmente equivalente” se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia de muNS mediante modificación, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las proteínas muNS mencionadas anteriormente. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de incorporarse a las inclusiones formadas por la proteína completa o muNS-Mi en una célula. Métodos adecuados para determinar la capacidad de incorporarse en las inclusiones incluye, pero no se limita al método descrito en el Ejemplo 3 del documento WO 2011/098652 basado en la formación de las inclusiones y expresión de la proteína de interés en forma de proteína de fusión asociada a los fragmentos que la dirigen a las inclusiones, y que se incorpora aquí por referencia. Posteriormente, se procedería a llevar a cabo inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos policlonales contra el epítipo HA o el epítipo de interés, pudiéndose comprobar la incorporación de dichos fragmentos a las inclusiones. Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de muNS arriba indicadas y que mantiene la capacidad de la proteína muNS de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo

BLAST (Altschul S.F. *et al.*, 1990, cited *supra*). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

5

En una realización particular, la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o la variante funcionalmente equivalente de la misma, carece de secuencias consenso de N-glicosilación. El término “secuencia consenso de N-glicosilación” ha sido descrito en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares aplican aquí de la misma manera.

10

En una realización preferida, el tercer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 25 (correspondiente a los aminoácidos 477-542 de la proteína MuNS del Orthoreovirus aviar, en donde la posición 28 de SEQ ID NO: 25 es cualquier aminoácido excepto Asn). En una realización aún más preferida, el tercer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 26 (correspondiente a los aminoácidos 477-542 de la proteína MuNS del Orthoreovirus aviar, en donde la posición 28 de SEQ ID NO: 26 es Ser).

20

El primer componente que comprende una secuencia señal de la vía secretora se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y tercer componente. El segundo componente que comprende un polipéptido de interés puede estar en posición N- ó C-terminal con respecto al tercer componente. En una realización preferida, el segundo componente está en posición N-terminal con respecto al tercer componente. En otra realización preferida, el segundo componente está en posición C-terminal con respecto al tercer componente.

25

Adicionalmente, en otra realización particular el segundo y tercer componentes de la proteína de fusión están conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de los dos componentes. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en la proteína de fusión de la invención incluyen enteroquinasa (SEQ ID NO: 17), factor Xa (SEQ ID NO: 18), trombina (SEQ ID NO: 19), proteasa TEV (SEQ ID NO: 20), proteasa PreScission (SEQ ID NO: 35), inteínas y similares.

35

Como será evidente para el experto en la materia, puede ser conveniente que el la proteína de fusión codificada por el segundo polinucleótido de la invención contenga además una etiqueta para facilitar su purificación.

- 5 Por tanto, en otra realización particular, el segundo polinucleótido de la invención codifica una proteína de fusión que comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente. En la realización particular en que el segundo y tercer componentes de la proteína de fusión están conectados por un péptido cuya
- 10 secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, el péptido para facilitar su purificación está en posición C-terminal con respecto al primer componente y N-terminal con respecto al tercer componente. Por lo tanto, en una realización preferida, el péptido para facilitar su purificación está en posición N-terminal con respecto al segundo componente. En otra realización preferida, el péptido para facilitar su purificación está en posición C-terminal con respecto al segundo componente.

- 15 El término "péptido para facilitar su purificación", ya ha sido descrito en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares aplican de igual manera aquí.

- 20 La presente invención también contempla la proteína de fusión codificada por el segundo polinucleótido de la invención. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una proteína de fusión codificada por el segundo polinucleótido de la invención, en adelante "proteína de fusión de la invención".

- 25 Asimismo, la invención se relaciona con una célula que comprende el segundo polinucleótido de la invención, así como con una célula que comprende la proteína de fusión de la invención, en adelante "segunda célula de la invención".

- La célula que se puede utilizar para llevar a cabo este aspecto ha sido descrita en relación
- 30 con el primer polinucleótido de la invención, por lo que no se hará referencia a ella en este aspecto.

Kit de la invención

La invención también proporciona kits que son adecuados para poner en práctica el método de la invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante "kit de la invención", que comprende:

(a) un componente A que comprende

- 5 - un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
 - (i) un componente A1 que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (ii) un componente A2 que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar
- 10 inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente;

o

- 15 - una célula que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
 - (i) un componente A1 que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (ii) un componente A2 que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar
- 20 inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente;

25 y

(b) un componente B que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:

- un componente B1 que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- un componente B2 que comprende un polipéptido de interés, y
- 30 - un componente B3 que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

35 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente.

Tal como se usa aquí, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de componentes que facilitan un proceso, método, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. Estos kits proporcionan los materiales necesarios para llevar a cabo los métodos descritos en la presente invención.

El kit de la invención comprende un componente A que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un componente A1 que comprende un péptido señal de la vía secretora, y un componente A2 que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente. Es decir, el primer componente del kit de la invención comprende el primer polinucleótido de la invención. Asimismo, como primer componente, el kit puede comprender la célula que expresa dicho primer polinucleótido de la invención.

El primer polinucleótido de la invención ha sido descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares son incorporadas aquí por referencia.

Como segundo componente, el kit comprende un componente B que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un componente B1 que comprende un péptido señal de la vía secretora, un componente B2 que comprende un polipéptido de interés, y un componente B3 que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente. Es decir, el segundo componente del kit de la invención comprende el segundo polinucleótido de la invención.

El segundo polinucleótido de la invención ha sido descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares son incorporadas aquí por referencia.

Adicionalmente, el kit de la invención puede comprender una célula adecuada para poner en práctica el kit. Dicha célula puede ser una célula procariota o una célula eucariota. En el kit de la invención puede usarse prácticamente cualquier célula huésped que pueda ser

transformada con los polinucleótidos de la invención, o que pueda ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante que contenga el primer, el segundo o ambos polinucleótidos de la invención, por ejemplo células animales (tal como células de mamífero, células de aves, células de insecto, etc.), células de plantas, levaduras, etc. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia.

Métodos de purificación de inclusiones formadas en el RE por muNS-Mi

Las inclusiones generadas por la expresión del polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, es decir, del primer polinucleótido de la invención, son fácilmente purificables mediante el método descrito en la sección de “Métodos” de los Ejemplos, del documento WO 2011/098652 y que se incorpora aquí por referencia.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método de purificación de un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en adelante “método de purificación de inclusiones de la invención”, en donde dicho método comprende

- (i) expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
 - (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima, y

- (ii) purificar las inclusiones formadas en la etapa (i).

Los términos “polipéptido”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula”, “inclusión”, “célula”, “polinucleótido”, “péptido señal de la vía secretora” y “polipéptido de interés” han sido descritas en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y sus definiciones y realizaciones particulares aplican aquí de la misma manera.

En una primera etapa (i), el método de purificación de inclusiones de la invención comprende expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima. Es decir, en una primera etapa, el primer método de purificación comprende expresar en una célula el primer polinucleótido de la invención en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima. El primer polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al método de purificación de inclusiones de la invención.

Como será evidente para el experto en la materia, el método de purificación de inclusiones de la invención es particularmente ventajoso para la purificación de un polipéptido de interés. Por lo tanto, para llevar a cabo este método, es necesario que el primer polinucleótido de la invención codifique un polipéptido que comprenda además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente.

El polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto

al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, se puede introducir en células huésped usando técnicas bien conocidas tal como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un vector de plásmido, viral o retroviral. Las células que comprenden la construcción génica pueden haber sido transfectadas de forma transitoria o de forma estable, para lo cual la transfección de la construcción génica se lleva a cabo simultáneamente con un gen que aporte resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia. El proceso de selección de células que contienen alguno o todas las construcciones de ADN de los componentes del primer complejo de la invención integrados de forma estable en el genoma se lleva a cabo mediante un proceso de selección. Para ello, se transfectan las células con el vector o mezclas de vectores y, tras un periodo de recuperación, se dejan crecer en un medio selectivo (bien un medio que contiene al antibiótico frente al que el reportero confiere resistencia o bien un medio mínimo que contiene el antimetabolito frente al cual el reportero confiere resistencia). Las colonias celulares que crecen en medio selectivo se aíslan y se vuelven a dejar crecer en medio selectivo.

Con el fin de generar con éxito las inclusiones en una célula, dicha célula se tiene que mantener en condiciones adecuadas para que la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones se vean favorecidas. El término “condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones”, según se usa en la presente invención, se refiere a las condiciones de cultivo de la célula que permiten que el polipéptido se transloque al interior del RE simultáneamente a la traducción del mismo o post-traduccionalmente y forme inclusiones espontáneamente. La translocación está mediada por el péptido señal de la vía secretora comprendido en el primer componente del polipéptido codificado por el primer polinucleótido de la invención, escindiéndose dicho péptido señal, mientras que la formación de inclusiones está mediada por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprendida en el segundo componente. Las condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía

secretora y la formación de inclusiones incluyen, sin limitación, las condiciones de cultivo adecuadas para la célula. Un experto en la materia sabría qué tipo de condiciones son las óptimas para cada tipo celular donde se expresen las inclusiones en el RE. La elección de dichos medios y condiciones de cultivos dependerá del microorganismo o línea celular elegida para la producción de las inclusiones en el RE. Las condiciones de cultivo adecuadas para la célula incluyen pH, temperatura, concentración de gases, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, tiempo de cultivo y condiciones de agitación. Por ejemplo, las condiciones de cultivo de la línea celular Sf9 de insecto comprenden el medio de insecto de Grace suplementado (en inglés *Grace's Insect Medium Supplemented*), 100% de aire, a 28 °C y 120 rpm durante 3 días.

Con el fin de comprobar si las inclusiones se han formado de una manera adecuada, el experto en la materia sabría qué métodos utilizar. Métodos adecuados para determinar si se han generado las inclusiones incluye, pero no se limita, la detección de las mismas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra muNS.

Una vez formadas las inclusiones en la célula, la segunda etapa consiste en la purificación de dichas inclusiones. Para ello, el primer paso sería la lisis de la célula por sonicación o por cualquier otro método conocido por el experto en la materia como mediante varios pases en una prensa francesa, mediante homogeneización usando un Politrón. Las inclusiones se obtienen tras una centrifugación en el pellet o precipitado, que posteriormente se resuspenderán en un tampón adecuado. Métodos adecuados para separar los agregados del resto de componentes presentes en la muestra incluyen, sin limitación, centrifugación diferencial, sedimentación, filtración, separación en gradiente de densidad y similares. En una realización preferida, el método de purificación de inclusiones es el descrito en el documento WO 2011/098652, que se incorpora aquí por referencia.

En una realización particular, el segundo componente del polipéptido codificado por el polinucleótido comprende la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 11 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En otra realización particular, el segundo componente del polipéptido codificado por el polinucleótido comprende la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula

correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

- Con objeto de aprovechar la inesperada mayor eficiencia en la formación de inclusiones por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus cuando ésta carece de N-glicosilaciones, es particularmente ventajoso para el método de purificación de inclusiones de la invención el empleo de un polinucleótido que codifica un polipéptido cuyo segundo componente carece no contiene N-glicosilaciones.
- 5 Por lo tanto, en otra realización particular, el segundo componente carece de secuencias consenso de N-glicosilaciones. El término “secuencia consenso de N-glicosilación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.
- 10 En una realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 20 En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 104 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 14.
- 25 En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 160 no es un resto de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 15.
- 30 En otra realización preferida, el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde los aminoácidos en posición 104 y 160 no son un restos de Asn. En una realización aún más preferida, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 16.
- 35 Como será evidente para el experto en la materia, puede ser conveniente que el polipéptido contenga además una etiqueta para facilitar su purificación. Por tanto, en otra realización

particular, el primer polinucleótido de la invención codifica un polipéptido que comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente. El término “péptido para facilitar su purificación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

En otra realización particular el polipéptido de interés y el segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, están conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa.

Esta realización permite la incubación de las inclusiones purificadas con una proteasa específica para dicha secuencia diana. El resultado es la escisión del polipéptido de interés de la inclusión. Finalmente, el polipéptido de interés se puede purificar por técnicas adecuadas para su purificación, que dependen de la naturaleza del polipéptido de interés y serán conocidas por el experto en la materia. Las técnicas de purificación de polipéptidos son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, inmunoprecipitación, etc.

Métodos de purificación de proteínas de fusión

1. Primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención

Las inclusiones generadas en el RE por muNS-Mi son fácilmente purificables con el método de purificación de inclusiones de la invención, por lo que si se dirige selectivamente una proteína a dichas inclusiones en el RE también se podría purificar dicha proteína de una manera sencilla y eficiente. Además, dicha proteína purificada mantiene su actividad biológica.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método de purificación de una proteína de fusión que comprende un polipéptido de interés y la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a las inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en adelante

“primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención” en donde dicho método comprende

- (i) expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido que comprende

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente,

en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima,

- (ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido, en donde dicho segundo polinucleótido es un polinucleótido codifica una proteína de fusión que comprende:

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,

- (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y

- (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente,

en condiciones adecuadas para la translocación de la proteína de fusión a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones formadas en la etapa (i), y

- (iii) purificar los complejos que comprenden las inclusiones formadas en la etapa (i) y las proteínas de fusión producidas en la etapa (ii),

en donde las etapas (i) y (ii) se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

Los términos “proteína de fusión”, “polipéptido”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una

célula”, “inclusión”, “célula”, “polinucleótido”, “péptido señal de la vía secretora”, “polipéptido de interés”, “polipéptido”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula” y “condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones” han sido descritas en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y sus definiciones y realizaciones particulares aplican aquí de la misma manera.

En una primera etapa (i), el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido que comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima. Es decir, en una primera etapa, el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende expresar el primer polinucleótido de la invención en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima. El primer polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención.

El experto en la materia apreciará que la primera etapa del primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención es análoga a la primera etapa del método de purificación de inclusiones de la invención, descrita en detalle previamente. Por lo tanto, las definiciones y realizaciones particulares de la primera etapa del método de purificación de inclusiones de la invención se incluyen aquí por referencia.

En una segunda etapa (ii), el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende expresar en una célula un segundo polinucleótido, en donde dicho segundo polinucleótido es un polinucleótido codifica una proteína de fusión que comprende un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y un tercer componente que

comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente, en condiciones adecuadas para la translocación de la proteína de fusión a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones producidas en la etapa (i). Es decir, en una segunda etapa, el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende expresar el segundo polinucleótido de la invención en condiciones adecuadas para la translocación de la proteína de fusión a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones formadas en la etapa (i). El segundo polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención.

El segundo polinucleótido de la invención, se puede introducir en células huésped usando técnicas bien conocidas tal como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un vector de plásmido, viral o retroviral. Las células que comprenden la construcción génica pueden haber sido transfectadas de forma transitoria o de forma estable, para lo cual la transfección de la construcción génica se lleva a cabo simultáneamente con un gen que aporte resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia. El proceso de selección de células que contienen alguno o todas las construcciones de ADN de los componentes del primer complejo de la invención integrados de forma estable en el genoma se lleva a cabo mediante un proceso de selección. Para ello, se transfectan las células con el vector o mezclas de vectores y, tras un periodo de recuperación, se dejan crecer en un medio selectivo (bien un medio que contiene al antibiótico frente al que el reportero confiere resistencia o bien un medio mínimo que contiene el antimetabolito frente al cual el reportero confiere resistencia). Las colonias celulares que crecen en medio selectivo se aíslan y se vuelven a dejar crecer en medio selectivo.

Con el fin de incorporar con éxito la proteína de fusión a las inclusiones formadas en el RE en la etapa (i), dicha célula se tiene que mantener en condiciones adecuadas para que la translocación del polipéptido a la vía secretora y la incorporación a las inclusiones se vean favorecidas. El término “condiciones adecuadas para la translocación de la proteína de fusión a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones”, según se usa en la presente invención, se refiere a las condiciones de cultivo de la célula que permiten que de la proteína de fusión se transloque al interior del RE simultáneamente a la traducción de la misma o post-traduccionalmente y se incorpore a las inclusiones presentes espontáneamente. La translocación está mediada por el péptido señal de la vía secretora comprendido en el primer componente de la proteína de fusión codificado por el segundo polinucleótido de la invención, escindiéndose dicho péptido señal, mientras que la incorporación de la proteína de fusión a las inclusiones está mediada por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprendida en el tercer componente de la proteína de fusión. Las condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la incorporación a las inclusiones incluyen, sin limitación, las condiciones de cultivo adecuadas para la célula. Un experto en la materia sabría qué tipo de condiciones son las óptimas para cada tipo celular donde se expresen las inclusiones en el RE. La elección de dichos medios y condiciones de cultivos dependerá del microorganismo o línea celular elegida para la producción de las inclusiones en el RE. Las condiciones de cultivo adecuadas para la célula incluyen pH, temperatura, concentración de gases, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, tiempo de cultivo y condiciones de agitación. Por ejemplo, las condiciones de cultivo de la línea celular Sf9 de insecto comprenden el medio de insecto de Grace suplementado (en inglés *Grace's Insect Medium Supplemented*), 100% de aire, a 28 °C y 120 rpm durante 3 días.

Con el fin de comprobar si las inclusiones se han formado y si la proteína de fusión se ha incorporado a las mismas de una manera adecuada, el experto en la materia sabría qué métodos utilizar. Métodos adecuados para determinar si se han generado las inclusiones incluye, pero no se limita, la detección de las mismas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra muNS. De igual manera, métodos adecuados para determinar si la proteína de fusión se ha incorporado a las inclusiones, incluye, pero no se limita, la detección de las mismas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra el polipéptido de interés comprendido en la proteína de fusión.

El resultado de la primera y segunda etapas (i) y (ii) del primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención será la formación de complejos entre la proteína de fusión y las inclusiones a través de una de las regiones descritas anteriormente que presentan afinidad por las inclusiones.

Las etapas (i) y (ii) del primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención se pueden llevar a cabo en cualquier orden. Por lo tanto, en una realización particular, el orden de las etapas es (i), (ii) y (iii). En otra realización particular, el orden de las etapas es (ii), (i) y (iii).

Una vez formadas las inclusiones en el RE e incorporada la proteína de fusión a las mismas, la tercera etapa (iii) consiste en la purificación de los complejos que comprenden las inclusiones formadas en la etapa (i) y las proteínas de fusión producidas en la etapa (ii).

La purificación de los complejos requiere en primer lugar de la lisis de las células y la liberación de los complejos al medio. Una vez que se han liberado los complejos al medio, se purifican usando métodos convencionales para la purificación de cuerpos de inclusión, tal y como se ha descrito anteriormente en el contexto del método de purificación de inclusiones de la invención. Métodos adecuados para separar los agregados del resto de componentes presentes en la muestra incluyen, sin limitación, centrifugación diferencial, sedimentación, filtración, separación en gradiente de densidad y similares.

Una vez que se dispone de una preparación de complejos formados por las inclusiones y la proteína de fusión, se puede separar la proteína de fusión de las inclusiones. Así, en otra realización particular, el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende además separar la proteína de fusión de las inclusiones.

Para ello, las inclusiones pueden ser solubilizadas usando agentes caotrópicos tales como, sin limitación, urea (de 4 M a 8 M), formamida (al menos un 80% v/v) e hidrocloreuro de guanidinio (de 4 M a 8 M). Algunos solventes que son capaces de solubilizar agregados incluyen, por ejemplo, SDS y ácido fórmico aunque su uso es inadecuado debido a la falta de inmunogenicidad y/o actividad. Una vez que se han solubilizado los cuerpos proteicos, las proteínas de fusión pueden ser recuperadas mediante la eliminación (mediante diálisis, por ejemplo) o dilución del agente desnaturizante, permitiéndose así la formación de proteínas de fusión activas inmunológica- o biológicamente activas. Asimismo, la separación de la

proteína de fusión de las inclusiones, se puede llevar a cabo en presencia de un tampón hipertónico, utilizando una concentración de NaCl de alrededor de 0,5 M, obteniendo la proteína de fusión en solución con una alta pureza. En una realización particular, dicho tampón hipertónico no presenta iones divalentes.

5

En una realización particular, el polipéptido de interés y el tercer componente comprendidos en la proteína de fusión, están conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa. Esta realización permite la incubación de las inclusiones purificadas con una proteasa específica para dicha secuencia diana. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enteroquinasa (SEQ ID NO: 17), factor Xa (SEQ ID NO: 18), trombina (SEQ ID NO: 19), proteasa TEV (SEQ ID NO: 20), proteasa PreScission (SEQ ID NO: 35), inteínas y similares. Un experto en la materia conocería las condiciones específicas de corte de cada una de las proteasas.

10

15

El resultado es la escisión del polipéptido de interés de la proteína de fusión incorporada en la inclusión. Finalmente, el polipéptido de interés se puede purificar por técnicas adecuadas para su purificación, que dependen de la naturaleza del polipéptido de interés y serán conocidas por el experto en la materia. Las técnicas de purificación de polipéptidos son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, inmunoprecipitación, etc.

20

Con objeto de aprovechar la inesperada mayor eficiencia en la formación de inclusiones por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus cuando ésta carece de N-glicosilaciones, es particularmente ventajoso para el método de purificación de inclusiones de la invención el empleo de un polinucleótido que codifica un polipéptido cuyo segundo componente carece no contiene N-glicosilaciones.

25

Por lo tanto, en otra realización particular, el segundo componente del primer polinucleótido de la invención carece de secuencias consenso de N-glicosilaciones. El término “secuencia consenso de N-glicosilación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

30

35

2. Segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención

Alternativamente, la proteína de fusión puede ser purificada empleando inclusiones preformadas. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la purificación de una proteína de fusión que comprende

- 5 (a) un polipéptido de interés, y
- (b) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,
- 10 a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en adelante “segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención”, en donde dicho método comprende:
 - (i) poner en contacto dicha composición con inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene
 - 15 la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones;
 - (ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i).

20 Los términos “proteína de fusión”, “polipéptido de interés”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula”, “inclusión”, “célula”,

25 “polipéptido”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones” han sido descritos en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y sus definiciones y realizaciones particulares aplican

30 aquí de la misma manera.

En el contexto del segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención se utiliza el término “composición que comprende la proteína de fusión” para hacer referencia a que la proteína de fusión no se encuentra pura y se puede encontrar en un extracto celular o

35 bien formando parte de una mezcla de proteínas o de otros componentes, preferiblemente procedentes de la lisis celular.

En una primera etapa (i), el segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende poner en contacto una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión con inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones. Es decir, en la primera etapa (i) se utilizan inclusiones preformadas por el primer polipéptido de la invención que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones. El primer polinucleótido de la invención que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención. En la etapa (i) también se utiliza la proteína de fusión de la invención. La proteína de fusión de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención.

El término “condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a inclusiones”, según se usa en la presente invención, se refiere a las condiciones que permiten la incorporación de la proteína de fusión a las inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación. Las condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a inclusiones incluyen el tampón adecuado para la proteína de fusión y la temperatura y debería incluir al menos un catión divalente a una concentración de al menos 0,5 mM. Un experto en la materia sabría qué tipo de condiciones son las óptimas para cada tipo de proteína de fusión. La elección de dichos tampones dependerá de la proteína de fusión elegida para su purificación. Por ejemplo, las condiciones de reclutamiento de la proteína de fusión a inclusiones pueden comprender el tampón PBS a 25 °C.

El término “catión divalente”, según se usa en la presente invención, se refiere a un ión cargado positivamente de cualquier metal de la tabla periódica que tenga una valencia de 2. Cationes divalentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación,

los cationes divalentes de Mg, Cd, Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn. En una forma preferida de realización, el catión divalente es Mg^{2+} . Concentraciones adecuadas de catión divalente para inducir la formación de agregados de la proteína muNS son, por ejemplo, al menos 0.01 mM, al menos 0,1 mM, al menos 1 mM, al menos 2 mM, al menos 3 mM, al menos 4 mM, al menos 5 mM o superiores.

La etapa (i) se lleva a cabo durante el tiempo necesario para que tenga lugar la formación de complejos de las inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación y de la proteína de fusión. Esto puede ser determinado, por ejemplo, mediante técnicas convencionales para determinar si una proteína se encuentra en forma soluble a una concentración determinada, tales como métodos turbidimétricos como la nefelometría, filtración y similares.

Con el fin de comprobar si la proteína de fusión se ha incorporado a las mismas de una manera adecuada, el experto en la materia sabría qué métodos utilizar. Métodos adecuados para determinar si la proteína de fusión se ha incorporado a las inclusiones, incluye, pero no se limita, la detección de las mismas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra el polipéptido de interés comprendido en la proteína de fusión.

El resultado de la primera etapa (i) del segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención será la formación de complejos entre la proteína de fusión y las inclusiones preformadas a través de una de las regiones descritas anteriormente que presentan afinidad por las inclusiones.

En una segunda etapa (ii), el segundo método de purificación de proteínas de fusión comprende purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i). En particular, si la proteína de fusión procedía de un extracto crudo de células en las que se había expresado dicha proteína, esta etapa permite separar los agregados del resto de componentes presentes en el extracto celular (polipéptidos, ácidos nucleicos, restos de pared celular, etc.). Métodos adecuados para separar los agregados del resto de componentes presentes en la muestra incluyen, sin limitación, centrifugación diferencial, sedimentación, filtración, separación en gradiente de densidad y similares.

El experto en la materia apreciará que la segunda etapa (ii) del segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención es equivalente a la tercera etapa (iii) del primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención, descrita en detalle previamente. Por lo tanto, las definiciones y realizaciones particulares de la tercera etapa (iii) del primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención se incluyen aquí por referencia.

Una vez que se dispone de una preparación de complejos formados por las inclusiones y la proteína de fusión, se puede separar la proteína de fusión de las inclusiones. Así, en otra realización particular, el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende además separar la proteína de fusión de las inclusiones.

Métodos para separar la proteína de fusión de las inclusiones se han descrito en detalle el contexto del segundo método de purificación de proteínas de fusión, y se incluyen aquí por referencia.

En una realización particular, el polipéptido de interés y el tercer componente comprendidos en la proteína de fusión, están conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa. Esta realización permite la incubación de las inclusiones purificadas con una proteasa específica para dicha secuencia diana. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enteroquinasa (SEQ ID NO: 17), factor Xa (SEQ ID NO: 18), trombina (SEQ ID NO: 19), proteasa TEV (SEQ ID NO: 20), proteasa PreScission (SEQ ID NO: 21), inteínas y similares. Un experto en la materia conocería las condiciones específicas de corte de cada una de las proteasas.

El resultado es la escisión del polipéptido de interés de la proteína de fusión incorporada en la inclusión. Finalmente, el polipéptido de interés se puede purificar por técnicas adecuadas para su purificación, que dependen de la naturaleza del polipéptido de interés y serán conocidas por el experto en la materia. Las técnicas de purificación de polipéptidos son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, inmunoprecipitación, etc.

En otra realización particular, el primer polinucleótido de la invención codifica un polipéptido que comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con

respecto al primer componente. El término “péptido para facilitar su purificación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

- 5 Con objeto de aprovechar la inesperada mayor eficiencia en la formación de inclusiones por la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus cuando ésta carece de N-glicosilaciones, es particularmente ventajoso para el método de purificación de inclusiones de la invención el empleo de un polinucleótido que codifica un polipéptido cuyo segundo componente carece no contiene N-glicosilaciones.

10

Por lo tanto, en otra realización particular, el segundo componente carece de secuencias consenso de N-glicosilaciones. El término “secuencia consenso de N-glicosilación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

15

3. Tercer método de purificación de proteínas de fusión de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la purificación de una proteína de fusión que comprende

20

- (a) un polipéptido de interés, y
- (b) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

25

a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en adelante “tercer método de purificación de proteínas de fusión de la invención”, en donde dicho método comprende:

30

- (i) poner en contacto dicha composición con un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho polipéptido con capacidad de formar inclusiones se encuentra en forma soluble, y
- en donde dicha puesta en contacto se realiza en presencia de una concentración de cationes divalentes adecuada para la formación de inclusiones a partir del polipéptido con capacidad de formar inclusiones y del reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones,

35

- (ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i).

Los términos “proteína de fusión”, “polipéptido de interés”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula”, “inclusión”, “célula”, “composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión”, “polipéptido”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula” y “catión divalente” han sido descritas en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y sus definiciones y realizaciones particulares aplican aquí de la misma manera.

En una primera etapa (i), el tercer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende poner en contacto una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión con un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho polipéptido con capacidad de formar inclusiones se encuentra en forma soluble, y en donde dicha puesta en contacto se realiza en presencia de una concentración de cationes divalentes adecuada para la formación de inclusiones a partir del polipéptido con capacidad de formar inclusiones y del reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones. Es decir, en la primera etapa (i) se emplea el primer polipéptido de la invención que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones. El primer polinucleótido de la invención que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención. En la etapa (i) también se utiliza la proteína de fusión de la invención. La proteína de fusión de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al segundo método de purificación de proteínas de fusión de la invención.

Para llevar a cabo la etapa (i) del tercer método de la invención, el polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de

secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho polipéptido con capacidad de formar inclusiones se encuentra en forma soluble. O de igual manera, polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de

5 secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho polipéptido con capacidad de formar inclusiones no se encuentra formando inclusiones.

La puesta en contacto de la etapa (i) se realiza en presencia de una concentración de cationes divalentes adecuada para la formación de inclusiones a partir del polipéptido con

10 capacidad de formar inclusiones y del reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones.

Preferiblemente, el polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición solubilizada se prepara a partir de agregados formados por la expresión del polipéptido que comprende

15 la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición o de fragmentos del polipéptido que comprende la

20 región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición o de inclusiones, seguidos de solubilización de los mismos en un medio en ausencia de cationes divalentes.

En una forma de realización aún más preferida, la proteína de fusión se encuentra en un tampón que contiene cationes divalentes en una concentración en exceso con respecto a la adecuada para la formación de agregados del polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación

30 con dicha composición, de forma que al mezclar la preparación de muNS con la mezcla que contiene la proteína de fusión se alcancen concentraciones adecuadas en la muestra de cationes divalentes como para que la proteína muNS forme agregados o inclusiones que incorporen la proteína de fusión. Así, en el caso de que la concentración óptima de cationes divalentes sea de 5 mM, la mezcla que contiene la proteína de fusión puede contener hasta

35 10 mM de dichos cationes, de forma que al combinar un volumen de la solución que contiene la proteína muNS soluble y un volumen de la mezcla que contiene la proteína de

fusión en ausencia de cationes divalentes se obtenga una concentración final de 5 mM que es adecuada para la formación de agregados de la proteína muNS. El experto puede calcular la concentración necesaria de catión divalente en la mezcla que contiene la proteína de fusión de forma que, al combinar ésta con la composición que comprende la proteína muNS o la variante de la misma, se alcancen concentraciones finales de catión divalente para que se formen las inclusiones.

La etapa (i) se lleva a cabo durante el tiempo necesario para que tenga lugar la formación de complejos del polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación y de la proteína de fusión. Esto puede ser determinado, por ejemplo, mediante técnicas convencionales para determinar si una proteína se encuentra en forma soluble a una concentración determinada, tales como métodos turbidimétricos como la nefelometría, filtración y similares.

En una segunda etapa (i), el segundo método de la invención comprende (ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión de la etapa (i). En particular, si la proteína de fusión procedía de un extracto crudo de células en las que se había expresado dicha proteína, esta etapa permite separar los agregados del resto de componentes presentes en el extracto celular (polipéptidos, ácidos nucleicos, restos de pared celular, etc.). Métodos adecuados para separar los agregados del resto de componentes presentes en la muestra incluyen, sin limitación, centrifugación diferencial, sedimentación, filtración, separación en gradiente de densidad y similares.

Una vez que se dispone de una preparación de complejos formados por las inclusiones y la proteína de fusión, se puede separar la proteína de fusión de las inclusiones. Así, en otra realización particular, el primer método de purificación de proteínas de fusión de la invención comprende además separar la proteína de fusión de las inclusiones.

Métodos para separar la proteína de fusión de las inclusiones se han descrito en detalle el contexto del segundo método de purificación de proteínas de fusión, y se incluyen aquí por referencia.

En una realización particular, el polipéptido de interés y el tercer componente comprendidos en la proteína de fusión, están conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa. Esta realización permite la incubación de las inclusiones

purificadas con una proteasa específica para dicha secuencia diana. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enteroquinasa (SEQ ID NO: 17), factor Xa (SEQ ID NO: 18), trombina (SEQ ID NO: 19), proteasa TEV (SEQ ID NO: 20), proteasa PreScission (SEQ ID NO: 35), inteínas y similares.

- 5 Un experto en la materia conocería las condiciones específicas de corte de cada una de las proteasas.

El resultado es la escisión del polipéptido de interés de la proteína de fusión incorporada en la inclusión. Finalmente, el polipéptido de interés se puede purificar por técnicas adecuadas para su purificación, que dependen de la naturaleza del polipéptido de interés y serán conocidas por el experto en la materia. Las técnicas de purificación de polipéptidos son ampliamente conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, inmunoprecipitación, etc.

15 En otra realización particular, el primer polinucleótido de la invención codifica un polipéptido que comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente. El término “péptido para facilitar su purificación” ha sido definido en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención y su definición y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

Métodos para identificar interacciones proteína-proteína

La posibilidad de expresar proteínas de interés en inclusiones formadas por muNS-Mi y de dirigir proteínas de interés a las inclusiones formadas muNS-Mi dentro del RE tiene múltiples aplicaciones potenciales además de la purificación de proteínas. Una de ellas es identificar interacciones entre proteínas modificadas post-traduccionalmente en el interior del RE. Así, si se etiqueta un polipéptido de interés con uno de los dominios descritos anteriormente para dirigirlo a los cuerpos de inclusión, éste podrá atraer otros polipéptidos que interaccionen fuertemente con él en el RE y relocalizarlos en las inclusiones.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante “primer método para la detección de interacciones de la invención”, que comprende:

- 35 (i) expresar en una célula un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
(a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y

(b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

5 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, y en donde el polipéptido de interés es el primer polipéptido, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

10 (ii) expresar en dicha célula un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y

15 (iii) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre el primer y segundo polipéptido,

en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo en cualquier orden.

20 Como apreciará el experto en la materia, la etapa (i) del primer método para la detección de interacciones de la invención emplea el primer polinucleótido de la invención. El primer polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al primer método para la detección de interacciones de la invención.

25 La primera etapa (i) del primer método para la detección de interacciones de la invención coincide con la primera etapa (i) del método de purificación de la invención, por lo que se hace referencia aquí a dicha etapa.

30 Una vez que se han expresado las inclusiones que comprenden el polipéptido de interés o primer polipéptido, se procede a expresar en dicha célula el segundo polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido. El término “péptido señal de la vía secretora”
35 ha sido descrito en detalle en el contexto del primer polinucleótido de la invención, y sus definiciones y realizaciones particulares se incluyen aquí por referencia.

Asimismo, el orden de las etapas (i) y (ii) puede variar, de manera que se exprese en primer lugar el segundo polinucleótido en lugar de las inclusiones. La expresión del segundo polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido, se llevará a cabo de manera similar al primer polipéptido, de manera que se hace referencia a la primera etapa (i) del método de purificación de la invención.

La última etapa del primer método para la detección de interacciones de la invención consiste en determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al primer polipéptido comprendido en las inclusiones generadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido, es indicativo de que ha existido interacción entre el primer y segundo polipéptido.

Métodos para detectar la interacción entre dos polipéptidos son conocidos por el experto en la materia, e incluyen, sin limitación electroforesis en condiciones nativas, cromatografía de exclusión molecular en condiciones adecuadas para detectar la interacción, centrifugación en gradiente, inmunoprecipitación, etc. En una forma preferida de realización, la detección de la asociación entre el primer y el segundo polipéptido se lleva a cabo mediante la detección mediante inmunofluorescencia o microscopía de fluorescencia.

Dicho método para la detección de la interacción de polipéptidos puede incluir la detección de la interacción de más de dos polipéptidos. Así, mediante el sistema de interacción a través de las inclusiones, se podría favorecer el ensamblaje de complejos supramoleculares en las células para su estudio estructural. Muchos complejos moleculares que están formados por múltiples proteínas son difíciles de obtener mediante los sistemas clásicos de expresión de proteínas. Probablemente, la posible dispersión de sus componentes individuales en la célula pueda dificultar la formación de dichos complejos. De manera natural, los viriones de reovirus son complejos supramoleculares que se ensamblan de una manera extremadamente eficiente en la célula infectada. Para aumentar dicha eficiencia, los componentes de los viriones son reclutados a las inclusiones de muNS de una manera ordenada y selectiva. De esta forma, al concentrarse en el mismo compartimento, aumentan las posibilidades de encontrar los ligandos adecuados. El presente método para la detección de la interacción de polipéptidos permite simular la morfogénesis de los reovirus, pero con proteínas exógenas que se pueden dirigir de forma selectiva a las inclusiones de muNS o

muNS-Mi dentro del RE. Para ello, dichos polipéptidos se pueden etiquetar con uno de los dominios mencionados anteriormente y dirigir varias proteínas de a las inclusiones de una manera sencilla y así incrementar sus posibilidades de encontrar los ligandos adecuados para el ensamblaje de complejos.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante “segundo método para la detección de interacciones de la invención”, que comprende:

- 10 (i) expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido codifica un polipéptido que comprende
 - (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones
 - 15 cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente, y

mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;
- 20 (ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:
 - (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
 - (b) un segundo componente que comprende dicho primer polipéptido, y
 - (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS
 - 25 de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente

- 30 en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones formadas en la etapa (i);
- (iii) expresar en dicha célula un tercer polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en
- 35 donde en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto

al segundo polipéptido, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y

- (iv) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i) y la proteína de fusión expresada en la etapa (ii), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre dicho primer y segundo polipéptido,

en donde las etapas (i), (ii) y (iii) se llevan a cabo en cualquier orden.

Como apreciará el experto en la materia, la etapa (i) del segundo método para la detección de interacciones de la invención emplea el primer polinucleótido de la invención, y la etapa (ii) del segundo método para la detección de interacciones de la invención emplea el segundo polinucleótido de la invención. El primer y el segundo polinucleótidos de la invención se han descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente al primer método para la detección de interacciones de la invención.

Las dos primeras etapas (i) y (ii) del segundo método para la detección de interacciones de la invención coinciden con las dos primeras etapas del primer método de purificación de la proteína de fusión de la invención, por lo que se hace referencia aquí a dichas etapas.

La expresión del tercer polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora y el segundo polipéptido, en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido, se llevará a cabo de manera similar al primer y segundo polinucleótidos, de manera que se hace referencia a la primera etapa (i) del método de purificación de la invención.

La última etapa del segundo método para la detección de interacciones de la invención consiste en determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al primer polipéptido comprendido en las inclusiones generadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido, es indicativo de que ha existido interacción entre el primer y segundo polipéptido. La última etapa del segundo método para la detección de interacciones de la invención coincide con la última etapa del primer método para la detección de interacciones de la invención, por lo que se hace referencia aquí a dicha etapa.

Alternativamente, dado que es posible ensamblar y desensamblar a voluntad las inclusiones formadas por la proteína muNS o por la región mínima de dicha proteína en función de la

presencia o no de cationes divalentes en la mezcla, la invención contempla un tercer método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante “tercer método para la detección de interacciones de la invención”, en donde dicho método comprende,

- 5 (i) poner en contacto inclusiones formadas por una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación y el primer polipéptido con el segundo polipéptido y
- (ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,
- 10 en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en adelante “cuarto método para la
 15 detección de interacciones de la invención”, que comprende

- (i) poner en contacto
 - (a) inclusiones formadas por una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación,
 - 20 (b) una proteína de fusión que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y el primer polipéptido y
 - 25 (c) el segundo polipéptido y
- (ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,
- en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

30 Los términos “polipéptido”, “inclusión”, “proteína de fusión”, “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación” y “región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones
 35 formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y el primer

polipéptido” han sido descritas en detalle anteriormente y sus definiciones y realizaciones particulares se incluyen en el contexto del tercer y cuarto métodos para la detección de interacciones de la invención por referencia.

- 5 La última etapa del tercer y cuarto métodos para la detección de interacciones de la invención consiste en determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al primer polipéptido comprendido en las inclusiones formadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido, es indicativo de que ha existido interacción entre el primer y segundo polipéptido. La última etapa del segundo método para la detección de interacciones de la
- 10 invención coincide con la última etapa del primer método para la detección de interacciones de la invención, por lo que se hace referencia aquí a dicha etapa.

Usos *in vitro* del primer y segundo polinucleótidos de la invención

- 15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso, en adelante uso *in vitro* de la invención, de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:
- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
 - (b) un segundo componente que comprende dicho primer polipéptido, y
 - (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un
- 20 Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,
- en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente
- 25 para incorporar el segundo componente del polipéptido codificado por dicho polinucleótido a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de
- 30 un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.
- 35 Como el experto en la materia apreciará, el uso *in vitro* del primer y segundo polinucleótidos de la invención emplea el primer polinucleótido de la invención, y la etapa (ii) del segundo

método para la detección de interacciones de la invención emplea el segundo polinucleótido de la invención. El primer y el segundo polinucleótidos de la invención se han descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente aquí.

5

Usos terapéuticos del primer y segundo polinucleótidos de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

- 10 (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y
 (c) un tercer componente que comprende un polipéptido de interés
 15 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y tercer componentes,
 para su uso en medicina, en adelante “primer uso terapéutico de la invención”.

Como el experto en la materia apreciará, el primer uso terapéutico de la invención emplea el
 20 primer polinucleótido de la invención. El primer polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente aquí.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica una proteína de
 25 fusión que comprende:

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
 (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y
 (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una
 30 proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,
 en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componentes,
 para su uso en medicina, en adelante “segundo uso terapéutico de la invención”.

35

Como el experto en la materia apreciará, el segundo uso terapéutico de la invención emplea el segundo polinucleótido de la invención. El segundo polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente aquí.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
- (b) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y
- (c) un tercer componente que comprende un polipéptido de interés

10

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente y tercer componentes,

15

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés, en adelante “tercer uso terapéutico de la invención”.

Como el experto en la materia apreciará, el tercer uso terapéutico de la invención emplea el primer polinucleótido de la invención. El primer polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican igualmente aquí.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:

25

- (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
- (b) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y
- (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

30

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés, en adelante “cuarto uso terapéutico de la invención”.

35

Como el experto en la materia apreciará, el cuarto uso terapéutico de la invención emplea el segundo polinucleótido de la invención. El segundo polinucleótido de la invención se ha descrito en detalle anteriormente, y sus definiciones y realizaciones particulares aplican
5 igualmente aquí.

El término “enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés”, según se utiliza en la invención, se refiere a enfermedades en las que la expresión de la proteína de fusión puede eliminar o reducir los síntomas de la enfermedad. En una forma
10 preferida, la enfermedad es una enfermedad que requiere la generación de una respuesta inmune frente al polipéptido de interés e incluye enfermedades tales como las causadas por infecciones virales si el polipéptido de interés se trata de un antígeno viral, enfermedades causadas por infecciones bacterianas si el polipéptido de interés se trata de un antígeno bacteriano, enfermedades causadas por infecciones fúngicas si el polipéptido de interés se
15 trata de un antígeno fúngico, alergias si el polipéptido de interés se trata de un alérgeno, enfermedades causadas por una infestación parasitaria si el polipéptido de interés se trata de un antígeno parasitario y/o un tumor si el polipéptido de interés se trata de un antígeno específico de células tumorales.

Enfermedades causadas por infecciones virales que pueden ser tratadas con la proteína de fusión incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por la infecciones por el virus VIH-1 (SIDA), por el herpesvirus humanos tales como el virus del herpes simple (herpes simple, herpes genital), citomegalovirus (mononucleosis, retinitis, hepatitis), el virus de Epstein Barr (mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo) y el virus de la
25 varicela zóster (varicela, herpes zóster); por los virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C, por paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano; flavivirus tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o el virus de la encefalitis japonesa) y
30 rotavirus. Otro tipo de infecciones virales que pueden ser tratadas se describen en detalle en Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991).

Enfermedades causadas por infecciones bacterianas que pueden ser tratadas con la
35 proteína de fusión incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por microorganismos del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*,

Aerobacter, Helicobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Heamophilus o Bordetella.

5

Enfermedades causadas por infecciones fúngicas que pueden ser tratadas con la proteína de fusión incluyen, sin limitación, candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, meningitis criptocócica y similares.

10 Infestaciones parasitarias que pueden ser tratadas con la proteína de fusión incluyen, sin limitación, paludismo, infección por *Pneumocystis jiroveci*, neumonía, enfermedad del sueño, leishmaniosis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosoma.

Trastornos de tipo alérgico que pueden ser tratados con la proteína de fusión incluyen, sin
15 limitación, alergias causadas por exposición al polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alergias causadas por exposición a alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), a alérgenos de la caspa y del pelo de animales y a alérgenos de la comida.

20 La proteína de fusión también es adecuada para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas. La expresión “enfermedad proliferativa”, según se usa en la presente invención, se refiere a enfermedades que están causadas o resultan de niveles inapropiadamente altos de división celular, de niveles inapropiadamente bajos de apoptosis o de ambos e incluye tanto tumores primarios como metástasis. El término “tumor primario”
25 se refiere a un tumor que se encuentra en el sitio primario en el que se originó dicho tumor. El término “metástasis”, según se usa en la presente invención, se refiere al proceso por el que un tumor se extiende a tejidos del organismo distintos al sitio primario de origen del tumor.

30 En el contexto de la invención, se entiende por “tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa” o “tratamiento de un tumor” la administración de la proteína de fusión para prevenir o retrasar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas del cáncer o tumor, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de metástasis. El tratamiento puede ser un tratamiento
35 profiláctico para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los

síntomas después de la manifestación de la enfermedad o en relación con su tratamiento quirúrgico o con radioterapia.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como
5 limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

10 *Disoluciones y tampones*

- Dapi: preparado a 100 µg/ml en agua estéril y esterilizado a través de un filtro de 0,22 µm.
- Medio de montaje: 6 g de glicerol; 2,4 g mowiol; 6 ml H₂O y 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5).
- 15 • PBS-BSA: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,2 mM KH₂PO₄ y 2% BSA.
- PBS-Paraformaldehído: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,2 mM KH₂PO₄ y 4% paraformaldehído despolimerizado
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,2 mM KH₂PO₄
- PBST-Leche: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 0,05%
20 Tween-20 y 5% de leche desnatada
- Tampón de electroforesis para SDS-PAGE 1X (Tris-glicina-SDS): 25mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM glicina y 0,1% SDS.
- Tampón de muestra de Laemmli: 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 5% de β-mercaptoetanol y 0,024% azul de bromofenol.
- 25 • Tampón de transferencia: 25mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM glicina y 20% metanol.

Plásmidos

Los plásmidos pCINeo-M3 (448-635), pcDNA 3.1/Zeo-muNS(477-542) y pGFP-C1-M3(477-542) se obtuvieron tal y como se describe en el documento WO 2011/098652.

30

Construcción del plásmido pcDNA-secmuNS-Mi

Para la construcción de este plásmido amplificamos la secuencia correspondiente a muNS-Mi a partir del molde pCINeo-M3 (448-635), utilizando los cebadores:

Forward 5'-TTGGCGCGCAAATGCCAGCCGTACTGCTGTC-3' (SEQ ID NO: 27)

35 Reverse 5'- TTGCGGCCGCAATCACAGATCATCCACC-3' (SEQ ID NO: 28).

La secuencia amplificada se introdujo en el plásmido de expresión pcDNA 3, en posición C-terminal, a continuación de la secuencia de entrada en el retículo endoplasmático (péptido señal) que ya contenía el plásmido.

5

*Construcción del plásmido pcDNA-secmuNS-Mi**

Para esta construcción se utilizó el plásmido pcDNA-secmuNS-Mi y se hizo mutagénesis utilizando los siguientes oligonucleótidos:

5'-GGGCCTGCTCGCTCGTTGTAGCGTATCTGGTGATTCAATCTCC-3' (SEQ ID NO: 29)

10 5'-GGAGATTGAATCACCAGATACGCTACAACGAGCGAGCAGGCCC-3' (SEQ ID NO: 30)

De esta forma se introduce una mutación en la posición 57 de muNS-Mi o 504 de muNS, cambiando una Asn por una Ser (N57S o N504S) y eliminando la diana de glucosilación.

15 La mutagénesis se realizó siguiendo el protocolo del kit que utilizamos: QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Qiagen)

*Construcción del plásmido pGFP-IC**

Para estas construcciones se utilizó el plásmido pGFP-C1-M3(477-542) y se hizo mutagénesis utilizando los siguientes oligonucleótidos;

20

5'-GGGCCTGCTCGCTCGTTGTAGCGTATCTGGTGATTCAATCTCC-3' (SEQ ID NO: 29)

5'-GGAGATTGAATCACCAGATACGCTACAACGAGCGAGCAGGCCC-3' (SEQ ID NO: 30)

De esta forma se introduce una mutación en la posición 57 de muNS-Mi o 504 de muNS cambiando una Asn por una Ser (N57S o N504S) y eliminando la diana de glucosilación.

25

La mutagénesis se realizó siguiendo el protocolo del kit que utilizamos: QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Qiagen)

30 *Construcción del plásmido pcDNA-VSVg-SV5-IC**

El ectodominio situado en el extremo N-terminal de la glicoproteína G de la envoltura lipídica del virus de la estomatitis vesicular (VSV), que tiene su propio péptido señal, se obtuvo a partir del RNA del virus VSV por medio de una RT-PCR utilizando los cebadores:

Forward_VSV: 5'-CGGCTAGCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGC -3' (SEQ ID NO: 31)

35 Reverse_VSV: 5'-CCCAAGCTTGGGAGAGCTCTTCCAACACTACTGAAC-3' (SEQ ID NO: 32).

La secuencia amplificada se introdujo en el plásmido de expresión pcDNA3.1 Zeo+, obteniendo como resultado el plásmido pcDNA-VSVg. Para poder detectar la proteína por inmunofluorescencia y por western-blot, se añadió el epitopo SV5 en el extremo C-terminal de la glicoproteína G truncada de VSV. Para ello, se generó un adaptador, hibridando los

5 siguientes oligonucleótidos:

5'-

GCCGGAATTCCGAAGGCCAAACCAATCCCAAACCCACTGCTGGGCCTGGATTTGCGGCC
GCAAAT-3' (SEQ ID NO: 33)

5'-

10 ATTTGCGGCCGCAAATCCAGGCCAGCAGTGGGTTTGGGATTGGTTTGCCTTCGGAATT
CCGGC-3' (SEQ ID NO: 34)

Tras digerir el adaptador con EcoRI y NotI, se insertó en el plásmido pcDNA-VSVg previamente digerido con los mismos enzimas, para generar el plásmido pcDNA-VSVg-SV5.

15

El dominio IC* (con la mutación N28S, correspondiente a la mutación N504 de la secuencia de la proteína muNS completa) se obtuvo mediante PCR usando como molde pcDNAMuNS-Mi* (que contiene la mutación N504S) y los cebadores:

Forward IC: 5'-TTGCGGCCGCAAGAAGATCACTTGTGGCTTATC -3' (SEQ ID NO: 36)

20 Reverse IC: 5'-GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTC-3' (SEQ ID NO: 37)

La secuencia de IC* se introdujo en posición C-terminal del dominio SV5 en el plásmido pcDNA-VSVg-SV5, generando el plásmido pcDNA-VSVg-SV5-IC*.

25 *Transfección*

Para la transfección se crecieron las células en monocapa en un multiwell de 12 pocillos. Se utilizó medio stock D-MEM en el cual se incubaron durante 15 minutos el plásmido con lipofectamina. Esta mezcla se añadió a las células pegadas en el multiwell con D-MEM stock y se incubaron de 3 a 5 h a 37°C, tras lo cual se retiró el medio y se añadió medio D-MEM

30 suplementado con FBS, antibióticos y glutamina.

Inmunofluorescencia

Se transfectaron células DF-1 con los plásmidos que dirigen la expresión de las proteínas al RE. Tras 24 horas de incubación, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS

35 durante 30 minutos, tras lo cual se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 1 hr con 2% soroalbúmina bovina (BSA) en PBS. Tras permeabilizar con 0,5% de TritonX-100 en

PBS se incubaron durante 1 hr. con anticuerpos primarios contra la proteína muNS. Tras lavar 3 veces con PBS, se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit IgG Sigma #A11012#) durante 1 hr, se montaron con Mowiol y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital DP-71.

En el caso de VSV-IC*, tras 24 horas de incubación, las células se fijaron con metanol a -20°C durante 15 minutos, tras lo cual se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 30 minutos con 2% de soroalbúmina bovina (BSA) en PBS. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios contra la proteína muNS (rabbit) y contra el epitopo SV5 (mouse) durante 1 hora. Tras lavar 3 veces con PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 (goat anti mouse) y Alexa Fluor 488 (goat anti rabbit) durante 30 minutos y se montaron con Mowiol para posteriormente ser observadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital DP-71.

Análisis de modificaciones post-traduccionales

Se transfectaron células DF-1 con los plásmidos que dirigen la expresión de las proteínas al RE. Tras 24 h de incubación, las células se lisaron en tampón RIPA* (50mM de TrisHCl (pH 8,0), 150mM de NaCl, 0,2% de SDS, inhibidor de proteasa) y se incubaron con N-glucosidasa durante 1 hr a 37°C. A continuación los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE y western-blot utilizando anticuerpos obtenidos contra la proteína viral muNS. Como anticuerpo secundario utilizamos Anti-Rabbit IgG conjugado con peroxidasa (Sigma #A0545#).

Mutagénesis

La mutagénesis se llevó a cabo utilizando el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1: Formación de inclusiones de muNS-Mi en el retículo endoplasmático (RE)

Para expresar muNS-Mi dentro del retículo endoplasmático (RE) se añadió una secuencia señal en el extremo aminoterminal de la secuencia que codifica para muNS-Mi. Para ello se utilizó la secuencia señal de entrada en el retículo endoplasmático: MGWSLILLFLVAVATGVHSQ (SEQ ID NO: 1). El plásmido resultante se denominó pcDNA-secmuNS-Mi y dirige la expresión de una fusión entre la secuencia señal y muNS-Mi, lo que en teoría provoca su introducción co-traducciona en el interior del RE.

Para comprobar si la proteína de fusión generada era capaz de formar inclusiones o microesferas en el interior del RE, se transfectaron células DF-1 con el plásmido pcDNA-secmuNS-Mi, permitiendo que la proteína se expresase durante 24 horas, tras lo cual se
 5 fijaron las células y se detectó la presencia de muNS-Mi por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína muNS. En paralelo, se transfectaron células con pcDNA 3.1/Zeo-muNS(477-542), que codifica muNS-Mi, para comparar la expresión de las dos versiones de la proteína vírica.

10 Se comprobó que la proteína con la secuencia señal producía microesferas en las células transfectadas, aunque estas eran bastante más pequeñas que las producidas por la proteína citosólica (Fig. 1). Sin embargo, la eficiencia en la formación de microesferas en el RE es menor que en el citosol: mientras que la práctica totalidad de la proteína citosólica detectada se encontraba formando microesferas (Fig. 1, imagen 1), menos del 50% de las células que
 15 expresaban la proteína en el RE presentaban microesferas.

Para comprobar si la proteína que contenía la secuencia señal se estaba incorporando al RE y si esto se traducía en algún tipo de modificación post-traducciona, se analizó la presencia de posibles glicosilaciones y/o enlaces disulfuro, modificaciones típicas de RE. La digestión
 20 con N-glucosidasa reveló que la proteína con secuencia señal presenta un peso molecular aparente ligeramente superior al de la proteína citosólica (Fig. 2.). Sin embargo, el tamaño de la proteína con secuencia señal disminuye tras tratarla con N-glicosidasa, mientras que no varía en absoluto el tamaño de la proteína citosólica tratada de la misma forma (Fig. 2), lo que confirma la presencia de glicosilaciones en Sec-muNS-Mi. Estos resultados confirman
 25 inequívocamente que la proteína con secuencia señal entra en el RE y es allí donde, de manera poco eficiente, forma microesferas.

Ejemplo 2: Mutación de Sec-MuNS-Mi para eliminar las N-glicosilaciones

30 Es posible que esas glicosilaciones afecten a la eficiencia en la formación de las microesferas en el interior del RE, ya que son grupos muy voluminosos que podría afectar a la interacción entre los monómeros de muNS para construir dichas estructuras. La proteína muNS nativa del reovirus aviar que es citosólica, no se glicosila. En vista de estos resultados, se analizó la presencia de dianas de N-glicosilación en la secuencia
 35 aminoacídica de muNS-Mi. Como resultado, se identificó la secuencia NVS en las

posiciones 504-506 de la secuencia de la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, es decir, dentro del dominio IC que es crucial para la formación de las microesferas.

Para comprobar si la glicosilación en la posición 504 es responsable de la menor eficiencia en la formación de inclusiones en el RE, se realizó una mutación puntual en la secuencia NVS, tanto de muNS-Mi como de Sec-MuNS-Mi. Para ello se modificó la Asn en posición 504 por una Ser. La presencia de la mutación se comprobó por secuenciación.

Seguidamente transfectamos células DF-1 con los plásmidos generados, permitiendo que la proteína se expresase durante 24 h, tras lo cual se fijaron las células y se detectó la presencia de muNS-Mi por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína muNS. El resultado del Western Blot reveló diferentes patrones electroforéticos para la proteína Sec-mNS-Mi y la versión mutada (Sec-muNS-Mi*), presentando Sec-muNS-Mi* menor peso molecular aparente que Sec-muNS-Mi (Fig. 3). El peso molecular de Sec-muNS-Mi* se corresponde con el peso molecular de Sec-muNS-Mi tras ser digerida con N-glicosidasa (Fig. 3). Estos resultados demuestran que efectivamente, la Asn en posición 504 estaba siendo N-glicosilada en el RE y que la Ser en posición 504 de la proteína mutada no lo está.

Ejemplo 3: Formación de inclusiones de muNS-Mi* en el citosol

Ya que la mutación N504S está dentro del dominio IC, que es imprescindible para la formación de inclusiones, se comprobó si este cambio afecta a la formación de inclusiones citosólicas. Para ello se transfectaron células DF-1 con los plásmidos que dirigen la expresión de las proteínas muNS-Mi y muNS-Mi*, para comparar la eficiencia de formación de inclusiones de ambas en el citosol. Las células transfectadas se incubaron durante 24 h, tras lo cual se fijaron las células y se detectó la presencia de muNS-Mi por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína muNS. Sorprendentemente, muNS-Mi y muNS-Mi* generaron inclusiones citosólicas similares de manera eficiente (Fig. 4).

Ejemplo 4: Incorporación de la proteína GFP a inclusiones de muNS-Mi* en el citosol

Para comprobar si la mutación N504S afectaba al reclutamiento de proteínas con el tag IC a las inclusiones formadas por muNS-Mi y muNS-Mi*, se efectuó la mutación correspondiente N28S en la región IC de la proteína de fusión GFP-IC para obtener GFP-IC*.

A continuación co-transfectaron células DF-1 con diferentes combinaciones de plásmidos para enfrentar muNS-Mi y muNS-Mi* con la proteína GFP etiquetada con GFP-IC y GFP-IC* (Fig. 5). Las células transfectadas se incubaron durante 24 h, tras lo cual se fijaron las células y se detectó la presencia de muNS-Mi por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína muNS. Los resultados mostrados en la figura 5 demuestran claramente que muNS-Mi* es capaz de reclutar tanto a GFP-IC (línea 2), como a GFP-IC* (línea 4), con la misma eficiencia que lo hace muNS-Mi (líneas 1 y 3).

Ejemplo 5: Formación de inclusiones de muNS-Mi* en el RE

Para comprobar si la mutación N504S es capaz de aumentar la eficiencia en la formación de las inclusiones en el interior del RE, se transfectaron células DF-1 con Sec-muNS-Mi o Sec-muNS-Mi* para determinar la capacidad de formación de inclusiones en el RE de ambas por inmunofluorescencia.

El análisis y comparación de la expresión de ambas proteínas demostró que, efectivamente, forma inclusiones en el interior del RE de manera mucho más eficiente, al contener inclusiones prácticamente todas las células (Fig. 6). Además, las inclusiones formadas por Sec-muNS-Mi* presentan una morfología diferente a las de la versión no mutada Sec-muNS-Mi, ya que son visiblemente más pequeñas que estas. Esto podría indicar que las esferas que se ven en las células que expresan la proteína no mutada, podrían no ser verdaderas inclusiones ordenadas, sino simplemente acúmulos de proteína en vesículas del sistema secretor (Fig. 1).

Ejemplo 6: Incorporación de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) a inclusiones de muNS-Mi* en el RE

Se co-transfectaron células DF-1 con pcDNA-secmuNS-Mi* y pcDNA-VSVg-SV5-IC*. Las células co-transfectadas se incubaron durante 24 h, tras lo cual se fijaron las células y se detectó la presencia de muNS-Mi por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína muNS (conejo) y anticuerpos contra SV5 (ratón). Como anticuerpos secundarios se utilizaron Alexa Fluor 594 goat anti mouse (A-11005) y Alexa Fluor 488 goat anti rabbit (A-11008).

Los resultados mostrados en la figura 7 revelan que el ectodominio de la glicoproteína G de VSV etiquetada con IC se incorpora eficientemente a las microesferas de muNS-Mi* en el interior del RE.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende
 - (i) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora, y
 - (ii) un segundo componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma,en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo componente.
2. Polinucleótido según la reivindicación 1, en donde el primer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
3. Polinucleótido según las reivindicaciones 1 o 2 en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 11.
4. Polinucleótido según la reivindicaciones 3, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 o una variante funcionalmente equivalente de la misma en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de asparagina.
5. Polinucleótido según la reivindicación 4, en donde el segundo componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.
6. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.
7. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polipéptido comprende además un polipéptido de interés en posición C-terminal con respecto al primer componente, y en donde el polipéptido de interés se selecciona del grupo formado por un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental y un antígeno tumoral.
8. Un polipéptido codificado por el polinucleótido de cualquiera según las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende:
- (i) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
 - (ii) un segundo componente que comprende un polipéptido de interés, y
 - (iii) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula, o una variante funcionalmente equivalente de la misma,
- en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente, y en donde el polipéptido de interés se selecciona del grupo formado por un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental y un antígeno tumoral.
10. Polinucleótido según la reivindicación 9, en donde el primer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
11. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde dicho tercer componente se selecciona del grupo formado por
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, o una variante funcionalmente equivalente de la misma
 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23, o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
 - un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
12. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula, o la variante funcionalmente equivalente de la misma, carecen de secuencias consenso de N-glicosilación.

13. Polinucleótido según la reivindicación 12, en donde el tercer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 25.
- 5 14. Polinucleótido según la reivindicación 13, en donde el tercer componente comprende la secuencia SEQ ID NO: 26.
- 10 15. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde la proteína de fusión comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.
- 15 16. Una proteína de fusión codificada por el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.
17. Una célula que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 9 a 15, el polipéptido según la reivindicación 9, o la proteína de fusión según la reivindicación 16.
18. Un kit que comprende:
 - 20 (i) un componente A seleccionado del grupo de:
 - un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - una célula que expresa un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - (ii) un componente B que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.
- 25 19. Método de purificación de un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula, en donde dicho método comprende
 - 30 (i) expresar en una célula un polinucleótido según la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima, y
 - (ii) purificar las inclusiones formadas en la etapa (i).

20. Método según la reivindicación 19, en donde el polipéptido comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.

5 21. Método de purificación de una proteína de fusión que comprende un polipéptido de interés y la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula, en
10 donde el polipéptido de interés se selecciona del grupo formado por un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental y un antígeno tumoral,

dicho método comprende

(i) expresar en una célula un primer polinucleótido, en donde dicho primer
15 polinucleótido es un polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y la formación de inclusiones a partir de dicha región mínima,

(ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido, en donde dicho segundo
20 polinucleótido es un polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en condiciones adecuadas para la translocación del polipéptido a la vía secretora y para el reclutamiento de la proteína de fusión a las inclusiones producidas en la etapa (i), y

(iii) purificar los complejos que comprenden las inclusiones formadas en la etapa
25 (i) y las proteínas de fusión producidas en la etapa (ii),

en donde las etapas (i) y (ii) se pueden llevar a cabo en cualquier orden.

22. Método de purificación de una proteína de fusión que comprende

(i) un polipéptido de interés, y
30 (ii) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,

a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en donde

35 dicho método comprende:

- 5 (i) poner en contacto dicha composición con inclusiones formadas por un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación en condiciones adecuadas para el reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones;
- (ii) purificar el complejo en la etapa (i) formado entre las inclusiones y la proteína de fusión.
- 10 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, que comprende adicionalmente separar la proteína de fusión de las inclusiones.
- 15 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde el polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación comprende la secuencia SEQ ID NO: 11 en donde el aminoácido en posición 57 no es un resto de asparagina.
- 20 25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde el polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 25 26. Método para la purificación de una proteína de fusión que comprende
- (a) un polipéptido de interés, y
- (b) la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula,
- 30 a partir de una composición en la que se encuentra dicha proteína de fusión, en donde dicho método comprende:
- (i) poner en contacto un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación con dicha composición; en donde dicho
- 35

polipéptido con capacidad de formar inclusiones se encuentra en forma soluble, y

en donde dicha puesta en contacto se realiza en presencia de una concentración de cationes divalentes adecuada para la formación de inclusiones a partir del polipéptido con capacidad de formar inclusiones y del reclutamiento de la proteína de fusión a dichas inclusiones, y

- (ii) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión en la etapa (i).

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, que comprende adicionalmente separar la proteína de fusión de las inclusiones.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en donde dicha la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula se selecciona del grupo formado por

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, o una variante funcionalmente equivalente de la misma
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23, o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

29. Método según la reivindicación 28, en donde la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprende la secuencia SEQ ID NO: 8.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, en donde la proteína de fusión comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.

31. Método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde

- el primer polipéptido es el polipéptido de interés según la reivindicación 7, y
- el segundo polipéptido está comprendido en una proteína de fusión I, comprendiendo dicha proteína de fusión I un péptido señal de la vía secretora y dicho segundo polipéptido, en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido,

dicho método comprende:

- (i) expresar en una célula un polinucleótido según la reivindicación 7, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;
- (ii) expresar en dicha célula un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión I, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y
- (iii) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre el primer y el segundo polipéptido,

en donde las etapas (i) y (ii) se llevan a cabo en cualquier orden.

32. Método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde

- el primer polipéptido está comprendido en una proteína de fusión II, comprendiendo dicha proteína de fusión II:
 - (a) un primer componente que comprende un péptido señal de la vía secretora,
 - (b) un segundo componente que comprende dicho primer polipéptido, y
 - (c) un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones dentro del retículo endoplasmático cuando se expresa en una célula,

en donde el primer componente se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo y al tercer componente, y

- el segundo polipéptido está comprendido en una proteína de fusión I, comprendiendo dicha proteína de fusión I un péptido señal de la vía secretora y dicho segundo polipéptido, en donde el péptido señal se encuentra en posición N-terminal con respecto al segundo polipéptido,

dicho método comprende:

- (i) expresar en una célula un primer polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;
- (ii) expresar en dicha célula un segundo polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión II en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones formadas en la etapa (i);
- (iii) expresar en dicha célula un tercer polinucleótido que codifica una proteína de fusión I, y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y
- (iv) determinar si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones generadas en la etapa (i) y la proteína de fusión II expresada en la etapa (ii), en donde si se detecta el segundo polipéptido es indicativo de la interacción entre dicho primer y segundo polipéptido,

en donde las etapas (i), (ii) y (iii) se llevan a cabo en cualquier orden.

33. Método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde

- el primer polipéptido está comprendido en una proteína de fusión III, comprendiendo dicha proteína de fusión III la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación y el primer polipéptido,

dicho método comprende,

- (i) poner en contacto inclusiones formadas por dicha proteína de fusión III con el segundo polipéptido, y
- (ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,

en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

34. Método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde

- el primer polipéptido está comprendido en una proteína de fusión IV, comprendiendo dicha proteína de fusión la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y el primer polipéptido,

dicho método comprende

(i) poner en contacto

- (a) inclusiones formadas por una proteína de fusión V que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula y que carece de secuencias consenso de N-glicosilación,

(b) dicha proteína de fusión IV, y

(c) el segundo polipéptido y

(ii) detectar la asociación del segundo polipéptido con las inclusiones,

en donde la detección del segundo polipéptido en las inclusiones es indicativo de la interacción entre el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 o 33, en donde el primer polipéptido comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.

36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 32 o 34, en donde dicha región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula se selecciona del grupo formado por

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 21, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, o una variante funcionalmente equivalente de la misma
- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23, o una variante funcionalmente equivalente de la misma y

- un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 24, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
- 5 37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 32, 34 o 36, en donde la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula carece de secuencias consenso de N-glicosilación.
- 10 38. Método según la reivindicación 37, en donde la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de incorporarse a inclusiones formadas por una proteína que comprende la mínima región de muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula comprende la secuencia SEQ ID NO: 25.
- 15 39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 32, 34 o 36 a 38, en donde la proteína de fusión comprende además un péptido para facilitar su purificación en posición C-terminal con respecto al primer componente.
- 20 40. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 para incorporar el segundo componente del polipéptido codificado por dicho polinucleótido a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 41. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 9 a 15 para su uso en medicina.
- 30 42. Uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 9 a 15 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en la que es necesaria la expresión del polipéptido de interés.

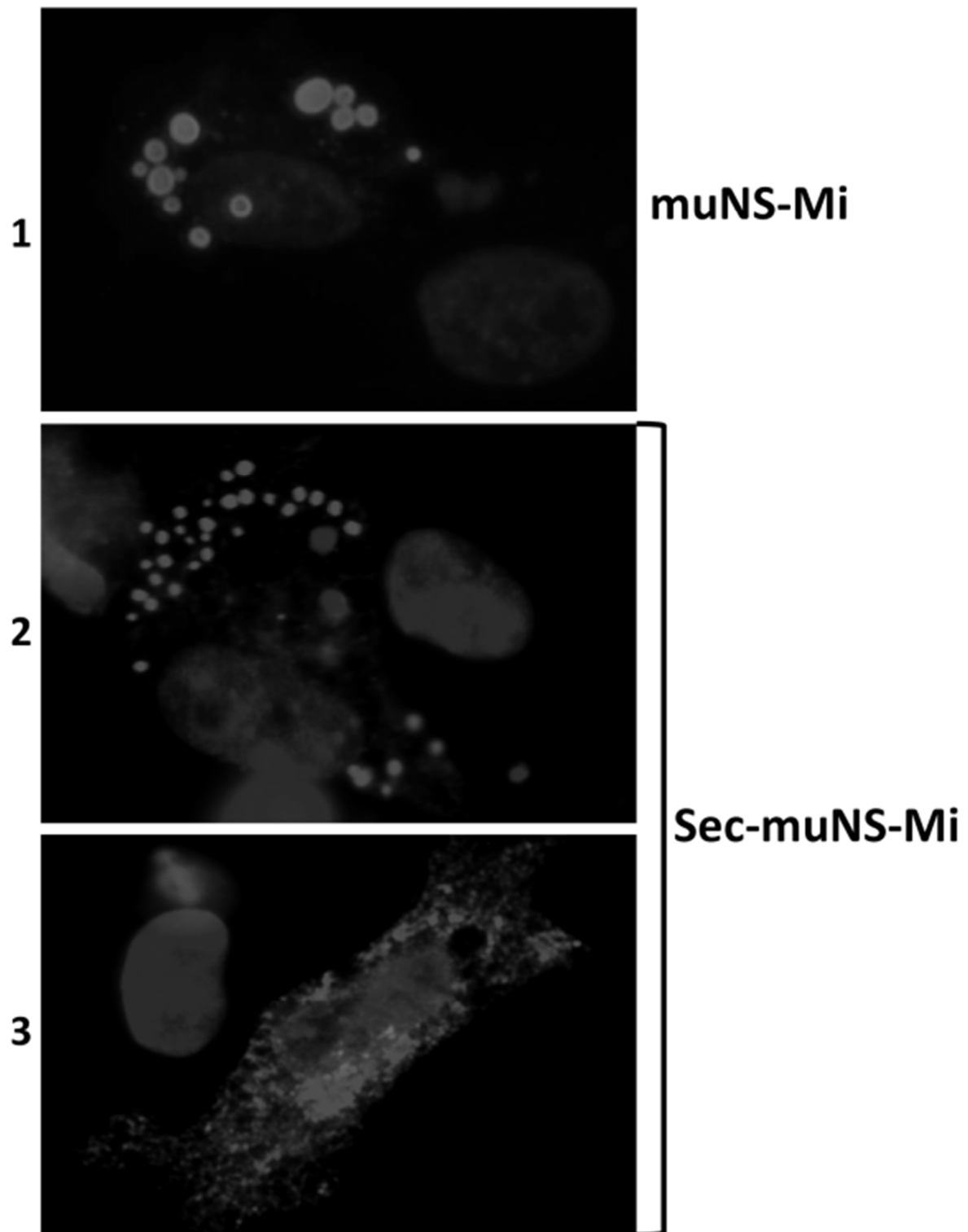


Figura 1

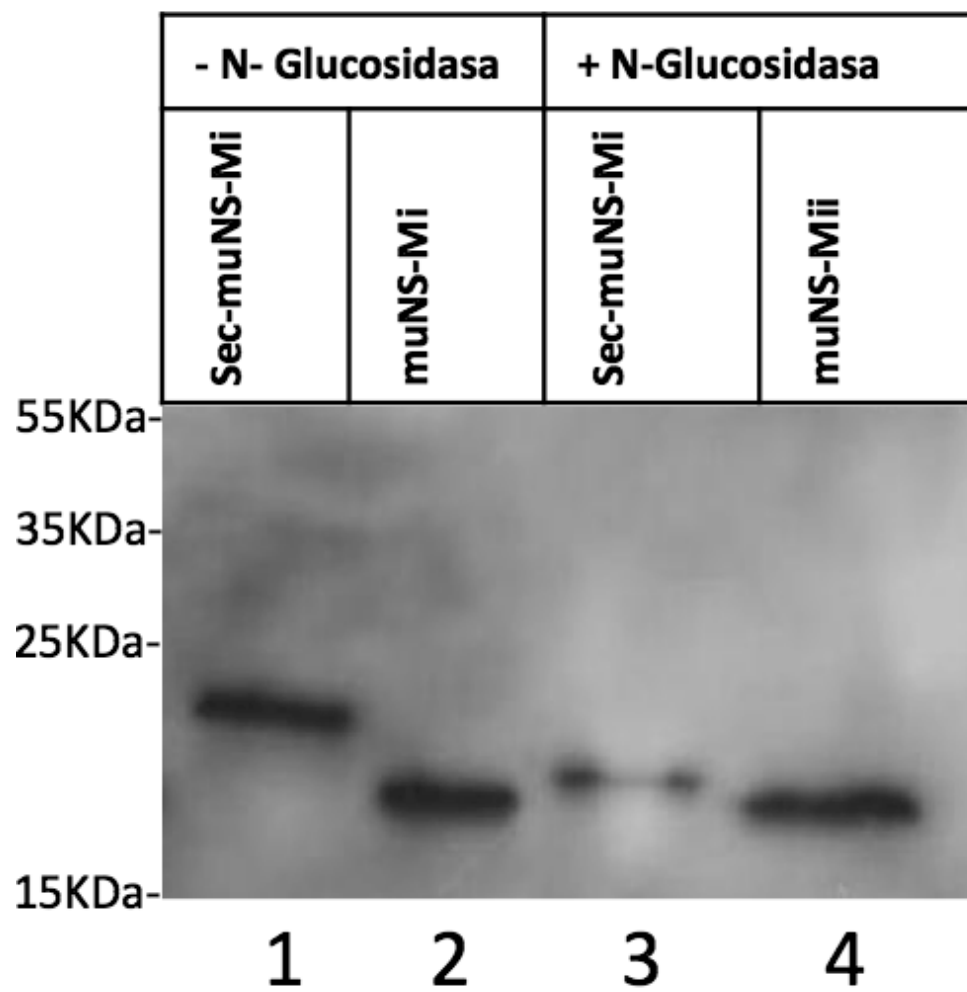


Figura 2

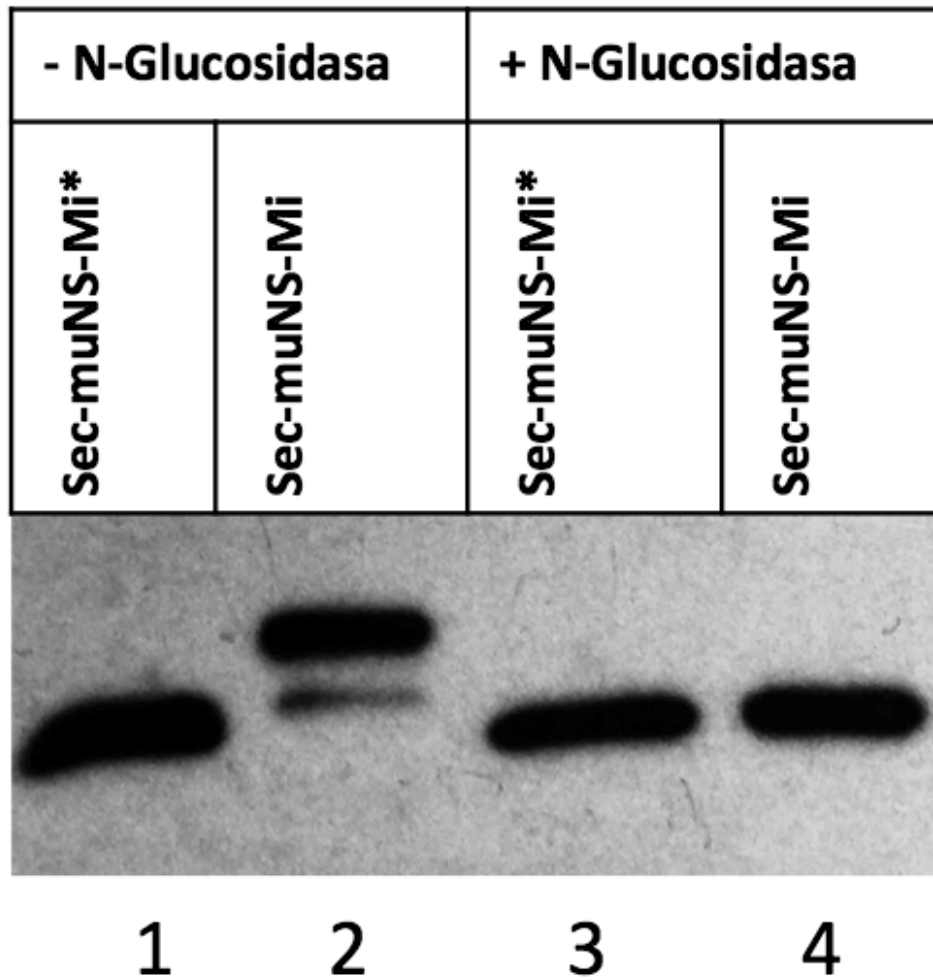


Figura 3

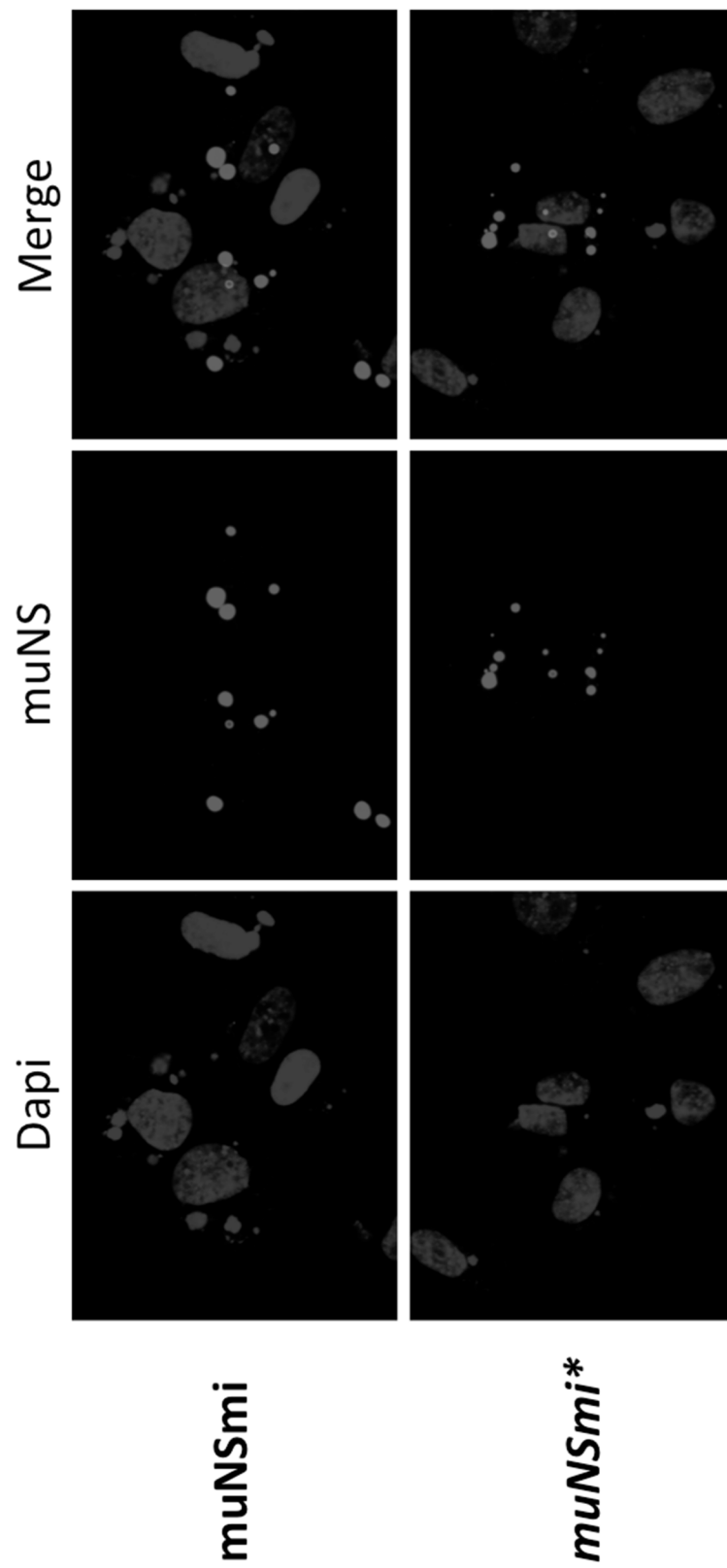


Figura 4

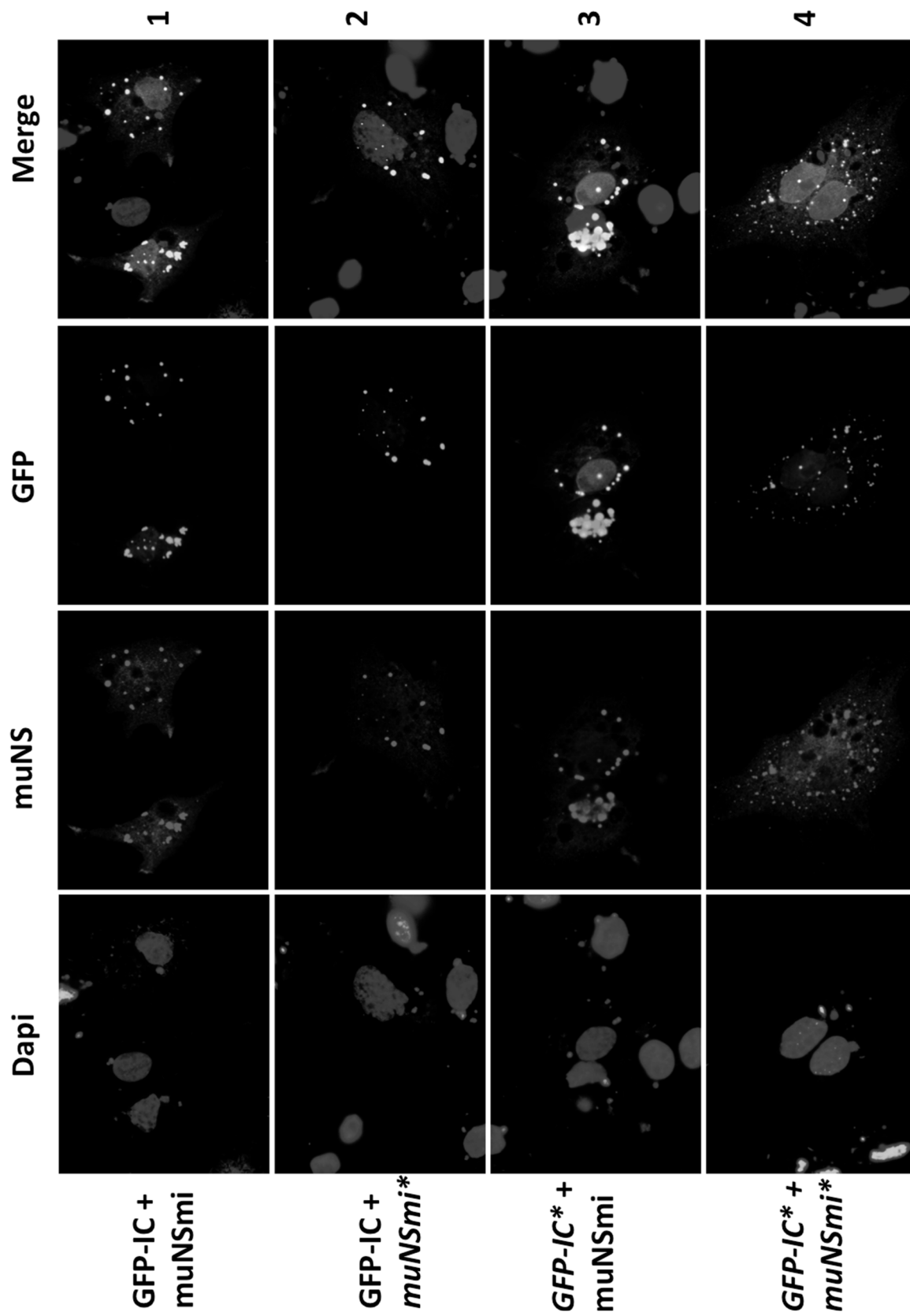


Figura 5

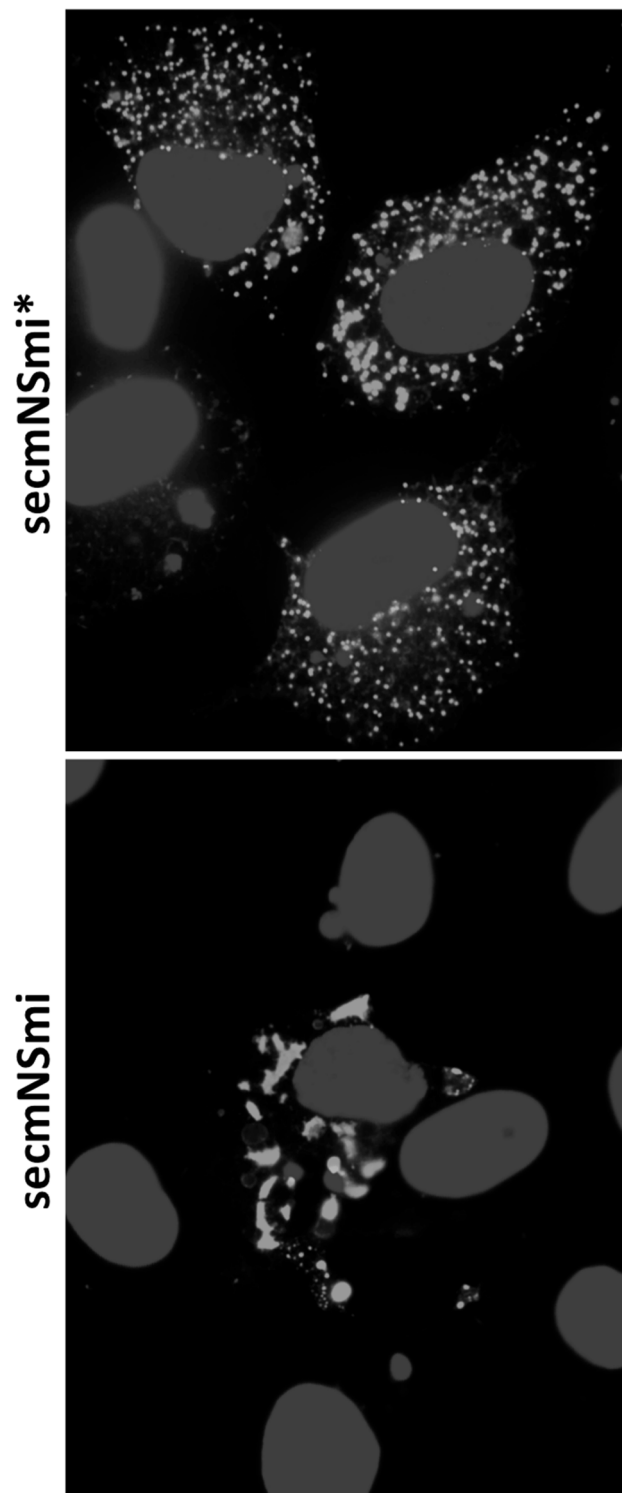


Figura 6

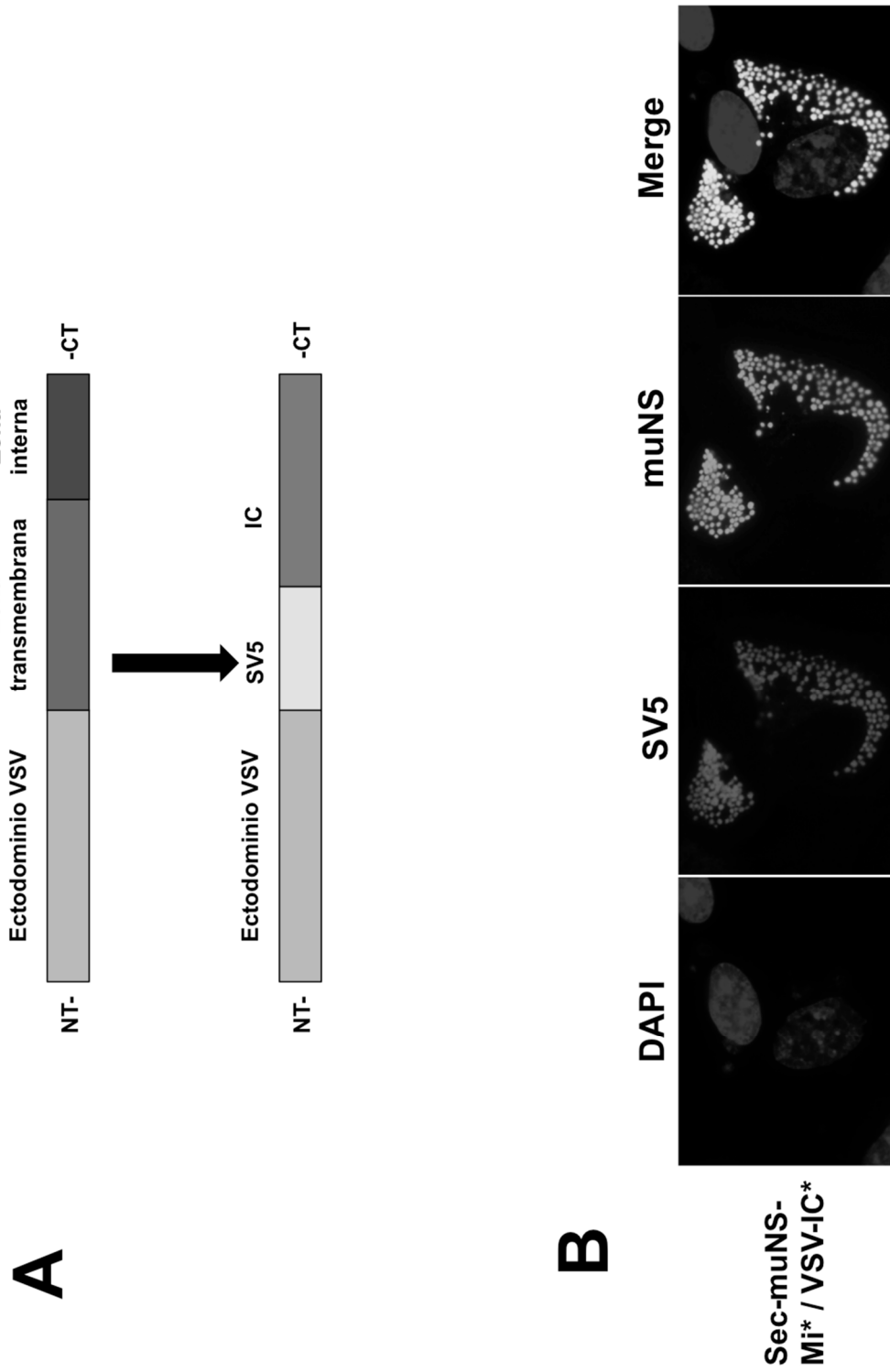


Figura 7

ES 2 548 784 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

<120> PROTEÍNA muNS CAPAZ DE FORMAR INCLUSIONES EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, MÉTODOS DE USO Y USOS DE LA MISMA

<130> P11023ES00

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido señal

<400> 1

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

Val	His	Ser	Gln
			20

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido señal

<400> 2

Met	Met	Ser	Phe	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	Phe	Trp	Ala
1				5					10					15	

Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Thr	Lys	Cys	Glu	Val	Phe	Gln
			20					25				

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Gly	Thr	Ala	Arg	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Cys
1				5					10					15	

Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu

ES 2 548 784 B2

20

25

<210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys
 20 25

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Leu Lys Glu Asp Val
 1 5 10 15

Arg Gly Ser Ala
 20

<210> 6
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Ser Pro Arg Ser Ser Gly Gln Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Ala Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 20 25 30

Leu Pro Leu Ala Pro Gly
 35

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ala Val
 1 5 10 15

ES 2 548 784 B2

Ala

<210> 8
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Lys Gly Leu Thr Val Ala Gly Leu Arg Ser Gly His Ile Tyr Gly
 20 25 30

<210> 9
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Orthoreovirus aviar

<400> 9

Met Ala Ser Thr Lys Trp Gly Asp Lys Pro Met Ser Leu Ser Met Ser
 1 5 10 15

His Asp Gly Ser Ser Ile Arg Ser Ala Ala Ser Gln Phe Leu Ser Val
 20 25 30

Pro Leu Ser His Ser Thr Pro Ile Pro Pro Gln Arg Lys Thr Val Leu
 35 40 45

Leu Lys Phe Met Ile Gly Asp Glu Leu Ile Thr Val Gln Gly Ala Leu
 50 55 60

Ala Pro Phe Asp Glu Tyr Trp Tyr Asp Asn Gln Pro Leu Leu Ala Gln
 65 70 75 80

Ala Val Glu Met Leu Ala Ser Ala Asp Arg Leu Arg Gln Phe Glu His
 85 90 95

Tyr Glu Lys Phe Leu Leu Lys Lys Gly His Gln Ile Thr Glu Ile Met
 100 105 110

Asn Arg Leu Arg Leu Phe Phe Thr Asp Val Leu Lys Val Lys Met Glu
 115 120 125

Ala Asp Ala Leu Pro Ala Leu Ala Gln Tyr Leu Met Val Gly Thr Leu

ES 2 548 784 B2

130		135		140
Glu Ala Val Ser Thr	Ala Asp Ser Pro Asp	Ala Cys Ala Pro Val Thr		
145	150	155	160	
Ser Lys Ile Leu	Ala Lys Gln Gln Thr	Ile Ala Lys Ser Pro Gly Arg		
	165	170	175	
Leu Asp Glu Glu Glu Tyr Asn Val	Ile Arg Ser Arg Phe Leu Thr His			
	180	185	190	
Glu Val Phe Asp Leu Thr Ser Asp Leu Pro Gly Val Gln Pro Phe Met				
	195	200	205	
Asp Met Tyr Tyr Ala Thr Val Pro Arg Ala Asp Ser Thr Gly Trp Cys				
	210	215	220	
Val Tyr Arg Arg Lys Gly Leu Leu Ile Tyr Ala Pro Asp Glu Gln Phe				
	225	230	235	240
Ser Asp Leu Thr Ile Phe Ser Thr Arg Leu Thr Ala Ser Arg Glu Leu				
	245	250	255	
Gln Leu Val Ala Gly Asp Val Val Val Ala Cys Phe Asp Leu Met Asp				
	260	265	270	
Val Ser Asp Ile Ala Pro Ser His His Ala Ser Val Gln Glu Glu Arg				
	275	280	285	
Thr Leu Gly Thr Ser Lys Tyr Ser Asn Val Thr Ala Asn Asp His Pro				
	290	295	300	
Leu Val Phe Phe Ser Pro Ser Ala Leu Arg Trp Ala Ile Asp His Ala				
	305	310	315	320
Cys Thr Asp Ser Leu Val Ser Thr Arg Asn Ile Arg Val Cys Val Gly				
	325	330	335	
Ile Asp Pro Leu Val Thr Arg Trp Thr Arg Asp Gly Val Gln Glu Ala				
	340	345	350	
Ala Ile Leu Met Asp Asp Lys Leu Pro Ser Ala Gly Arg Ala Arg Met				
	355	360	365	
Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ser Pro Met Pro Ser Phe				
	370	375	380	

ES 2 548 784 B2

Leu Leu Gly Ala Leu Lys Gln Ser Gly Gly Gln Leu Leu Glu His Tyr
385 390 395 400

Arg Cys Asp Ala Ala Asn Arg Tyr Gly Ser Pro Thr Val Pro Ile Ser
405 410 415

His Pro Pro Pro Cys Ser Lys Cys Pro Glu Leu Lys Glu Gln Ile Ala
420 425 430

Lys Leu Ser Ser Ser Pro Ile Pro Lys Val Asp Ser Ser Val Gly Pro
435 440 445

Ala Ala Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Leu Gln Arg Ala Asn Arg Glu
450 455 460

Leu Ser Leu Lys Leu Val Asp Val Gln Pro Ala Arg Glu Asp His Leu
465 470 475 480

Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala Lys Asp His Glu
485 490 495

Lys Gly Leu Leu Ala Arg Cys Asn Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser
500 505 510

Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe Glu Thr Arg Leu
515 520 525

Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val Glu Ala Leu Asn
530 535 540

Gln Glu Leu Ala Lys Ala Arg Val Glu Gln Gln Asp Met Met Thr Gln
545 550 555 560

Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Glu Arg Asp Glu Leu Leu Gln Glu Val Asp
565 570 575

Glu Leu Lys Arg Glu Leu Thr Thr Leu Arg Ser Ala Asn Val Arg Leu
580 585 590

Asn Ala Asp Asn His Arg Met Ser Arg Ala Thr Arg Val Gly Asp Ala
595 600 605

Phe Val Ser Asp Val Glu Pro Leu Pro Ser Gly Ile Pro Gly Glu Ser
610 615 620

ES 2 548 784 B2

Lys Pro Ser Met Glu Glu Leu Val Asp Asp Leu
625 630 635

<210> 10
<211> 721
<212> PRT
<213> Orthoreovirus mamífero

<400> 10

Met Ala Ser Phe Lys Gly Phe Ser Ala Asn Thr Val Pro Val Ser Lys
1 5 10 15

Ala Lys Arg Asp Ile Ser Ser Leu Ala Ala Thr Pro Gly Leu Arg Ser
20 25 30

Gln Ser Phe Thr Pro Ser Val Asp Met Ser Gln Ser Arg Glu Phe Leu
35 40 45

Thr Lys Ala Ile Glu Gln Gly Ser Met Ser Ile Pro Tyr Gln His Val
50 55 60

Asn Val Pro Lys Val Asp Arg Lys Val Val Ser Leu Val Val Arg Pro
65 70 75 80

Phe Ser Ser Gly Ala Phe Ser Ile Ser Gly Val Ile Ser Pro Ala His
85 90 95

Ala Tyr Leu Leu Glu Cys Leu Pro Gln Leu Glu Gln Ala Met Ala Phe
100 105 110

Val Ala Ser Pro Glu Ser Phe Gln Ala Ser Asp Val Ala Lys Arg Phe
115 120 125

Ala Ile Lys Pro Gly Met Ser Leu Gln Asp Ala Ile Thr Ala Phe Ile
130 135 140

Asn Phe Val Ser Ala Met Leu Lys Met Thr Val Thr Arg Gln Asn Phe
145 150 155 160

Asp Val Ile Val Ala Glu Ile Glu Arg Leu Ala Ser Thr Ser Val Ser
165 170 175

Val Arg Thr Lys Glu Ala Lys Val Ala Asp Glu Glu Leu Met Leu Phe
180 185 190

Gly Leu Asp His Arg Gly Pro Gln Gln Leu Asp Val Ser Asp Ala Lys

ES 2 548 784 B2

195		200		205
Gly Ile Met Lys Ala Ala Asp Ile Gln Thr Thr His Asp Val His Leu				
210		215		220
Ala Pro Gly Val Gly Asn Ile Asp Pro Glu Ile Tyr Asn Glu Gly Arg				
225		230		235
				240
Phe Met Phe Met Gln His Lys Pro Leu Ala Ala Asp Gln Ser Tyr Phe				
		245		250
				255
Thr Leu Glu Thr Ala Asp Tyr Phe Lys Ile Tyr Pro Thr Tyr Asp Glu				
		260		265
				270
His Asp Gly Arg Met Ala Asp Gln Lys Gln Ser Gly Leu Ile Leu Cys				
		275		280
				285
Thr Lys Asp Glu Val Leu Ala Glu Gln Thr Ile Phe Lys Leu Asp Ala				
		290		295
				300
Pro Asp Asp Lys Thr Val His Leu Leu Asp Arg Asp Asp Asp His Val				
305		310		315
				320
Val Ala Arg Phe Thr Lys Val Phe Ile Glu Asp Val Ala Pro Gly His				
		325		330
				335
His Ala Ala Gln Arg Ser Gly Gln Arg Ser Val Leu Asp Asp Leu Tyr				
		340		345
				350
Ala Asn Thr Gln Val Ile Ser Ile Thr Ser Ala Ala Leu Lys Trp Val				
		355		360
				365
Val Lys His Gly Val Ser Asp Gly Ile Val Asn Arg Lys Asn Val Lys				
		370		375
				380
Val Cys Val Gly Phe Asp Pro Leu Tyr Thr Leu Ser Thr His Asn Gly				
385		390		395
				400
Val Ser Leu Cys Ala Leu Leu Met Asp Glu Lys Leu Ser Val Leu Asn				
		405		410
				415
Ser Ala Cys Arg Met Thr Leu Arg Ser Leu Met Lys Thr Gly Arg Asp				
		420		425
				430
Val Asp Ala His Arg Ala Phe Gln Arg Val Leu Ser Gln Gly Tyr Thr				
		435		440
				445

ES 2 548 784 B2

Ser	Leu	Met	Cys	Tyr	Tyr	His	Pro	Ser	Arg	Lys	Leu	Ala	Tyr	Gly	Glu
	450					455					460				
Val	Leu	Phe	Leu	Glu	Arg	Ser	Asn	Asp	Val	Thr	Asp	Gly	Ile	Lys	Leu
465					470					475					480
Gln	Leu	Asp	Ala	Ser	Arg	Gln	Cys	His	Glu	Cys	Pro	Val	Leu	Gln	Gln
				485					490					495	
Lys	Val	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Ile	Met	Gln	Lys	Ser	Ile	Gln
			500					505					510		
Ser	Asp	Pro	Thr	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Arg
		515					520					525			
Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Val	Thr	Arg	Leu	Gln	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala
	530					535					540				
Gln	Ser	Leu	Asn	Ala	Gln	Leu	Glu	Ala	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Gln	Ser
545					550					555					560
Cys	Ser	Leu	Asp	Met	Tyr	Leu	Arg	His	His	Thr	Cys	Ile	Asn	Gly	His
				565					570					575	
Ala	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Val	Ala	Pro	Asp	Val
			580					585					590		
Arg	Arg	Glu	Ile	Met	Glu	Lys	Arg	Ser	Glu	Val	Arg	Gln	Gly	Trp	Cys
		595					600					605			
Glu	Arg	Ile	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Cys	Gln	Thr	Val	Ile	Asp
	610					615					620				
Asp	Leu	Thr	Leu	Met	Asn	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Thr	Glu	Leu
625					630					635					640
Arg	Asp	Ser	Ala	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Gln	Ile	Ala	Glu	Leu	Val	Ser
				645					650					655	
Thr	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Ile	Thr	Tyr	Gln	Gln	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu
			660					665					670		
Val	Ala	Lys	Asn	Val	Glu	Leu	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	Arg	Gln	Ala	Lys
		675					680					685			

ES 2 548 784 B2

Ser Leu Arg Ile Thr Pro Ser Leu Leu Ser Ala Thr Pro Ile Asp Ser
 690 695 700

Ala Asp Gly Val Ala Asp Leu Ile Asp Phe Ser Val Pro Thr Asp Glu
 705 710 715 720

Leu

<210> 11
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Orthoreovirus aviar

<400> 11

Pro Ala Val Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Leu Gln Arg Ala Asn Arg
 1 5 10 15

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

Leu Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala Lys Asp His
 35 40 45

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

Ser Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe Glu Thr Arg
 65 70 75 80

Leu Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val Glu Ala Leu
 85 90 95

Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Arg Val Glu Gln Gln Asp Met Met Thr
 100 105 110

Gln Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Glu Arg Asp Glu Leu Leu Gln Glu Val
 115 120 125

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

Leu Asn Ala Asp Asn His Arg Met Ser Arg Ala Thr Arg Val Gly Asp
 145 150 155 160

Ala Phe Val Ser Asp Val Glu Pro Leu Pro Ser Gly Ile Pro Gly Glu

ES 2 548 784 B2

	165		170		175
Ser Lys Pro Ser Met Glu Glu Leu Val Asp Asp Leu					
	180		185		
<210> 12					
<211> 251					
<212> PRT					
<213> Orthoreovirus mamífero					
<400> 12					
Ser Asn Asp Val Thr Asp Gly Ile Lys Leu Gln Leu Asp Ala Ser Arg					
1	5		10		15
Gln Cys His Glu Cys Pro Val Leu Gln Gln Lys Val Val Glu Leu Glu					
	20		25		30
Lys Gln Ile Ile Met Gln Lys Ser Ile Gln Ser Asp Pro Thr Pro Val					
	35		40		45
Ala Leu Gln Pro Leu Leu Ser Gln Leu Arg Glu Leu Ser Ser Glu Val					
	50		55		60
Thr Arg Leu Gln Met Glu Leu Ser Arg Ala Gln Ser Leu Asn Ala Gln					
	65		70		75
Leu Glu Ala Asp Val Lys Ser Ala Gln Ser Cys Ser Leu Asp Met Tyr					
	85		90		95
Leu Arg His His Thr Cys Ile Asn Gly His Ala Lys Glu Asp Glu Leu					
	100		105		110
Leu Asp Ala Val Arg Val Ala Pro Asp Val Arg Arg Glu Ile Met Glu					
	115		120		125
Lys Arg Ser Glu Val Arg Gln Gly Trp Cys Glu Arg Ile Ser Lys Glu					
	130		135		140
Ala Ala Ala Lys Cys Gln Thr Val Ile Asp Asp Leu Thr Leu Met Asn					
	145		150		155
Gly Lys Gln Ala Gln Glu Ile Thr Glu Leu Arg Asp Ser Ala Glu Lys					
	165		170		175
Tyr Glu Lys Gln Ile Ala Glu Leu Val Ser Thr Ile Thr Gln Asn Gln					
	180		185		190

ES 2 548 784 B2

Ile Thr Tyr Gln Gln Glu Leu Gln Ala Leu Val Ala Lys Asn Val Glu
195 200 205

Leu Asp Ala Leu Asn Gln Arg Gln Ala Lys Ser Leu Arg Ile Thr Pro
210 215 220

Ser Leu Leu Ser Ala Thr Pro Ile Asp Ser Val Asp Asp Val Ala Asp
225 230 235 240

Leu Ile Asp Phe Ser Val Pro Thr Asp Glu Leu
245 250

<210> 13

<211> 188

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus
aviar que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se
expresa en una célula

<400> 13

Pro Ala Val Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Leu Gln Arg Ala Asn Arg
1 5 10 15

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

Leu Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala Lys Asp His
35 40 45

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

Ser Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe Glu Thr Arg
65 70 75 80

Leu Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val Glu Ala Leu
85 90 95

Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Arg Val Glu Gln Gln Asp Met Met Thr
100 105 110

Gln Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Glu Arg Asp Glu Leu Leu Gln Glu Val
115 120 125

ES 2 548 784 B2

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

Leu Asn Ala Asp Asn His Arg Met Ser Arg Ala Thr Arg Val Gly Asp
 145 150 155 160

Ala Phe Val Ser Asp Val Glu Pro Leu Pro Ser Gly Ile Pro Gly Glu
 165 170 175

Ser Lys Pro Ser Met Glu Glu Leu Val Asp Asp Leu
 180 185

<210> 14

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus
 mamífero que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se
 expresa en una célula

<400> 14

Ser Asn Asp Val Thr Asp Gly Ile Lys Leu Gln Leu Asp Ala Ser Arg
 1 5 10 15

Gln Cys His Glu Cys Pro Val Leu Gln Gln Lys Val Val Glu Leu Glu
 20 25 30

Lys Gln Ile Ile Met Gln Lys Ser Ile Gln Ser Asp Pro Thr Pro Val
 35 40 45

Ala Leu Gln Pro Leu Leu Ser Gln Leu Arg Glu Leu Ser Ser Glu Val
 50 55 60

Thr Arg Leu Gln Met Glu Leu Ser Arg Ala Gln Ser Leu Asn Ala Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Ala Asp Val Lys Ser Ala Gln Ser Cys Ser Leu Asp Met Tyr
 85 90 95

Leu Arg His His Thr Cys Ile Ser Gly His Ala Lys Glu Asp Glu Leu
 100 105 110

Leu Asp Ala Val Arg Val Ala Pro Asp Val Arg Arg Glu Ile Met Glu
 115 120 125

Lys Arg Ser Glu Val Arg Gln Gly Trp Cys Glu Arg Ile Ser Lys Glu

ES 2 548 784 B2

130 135 140

Ala Ala Ala Lys Cys Gln Thr Val Ile Asp Asp Leu Thr Leu Met Asn
 145 150 155 160

Gly Lys Gln Ala Gln Glu Ile Thr Glu Leu Arg Asp Ser Ala Glu Lys
 165 170 175

Tyr Glu Lys Gln Ile Ala Glu Leu Val Ser Thr Ile Thr Gln Asn Gln
 180 185 190

Ile Thr Tyr Gln Gln Glu Leu Gln Ala Leu Val Ala Lys Asn Val Glu
 195 200 205

Leu Asp Ala Leu Asn Gln Arg Gln Ala Lys Ser Leu Arg Ile Thr Pro
 210 215 220

Ser Leu Leu Ser Ala Thr Pro Ile Asp Ser Val Asp Asp Val Ala Asp
 225 230 235 240

Leu Ile Asp Phe Ser Val Pro Thr Asp Glu Leu
 245 250

<210> 15

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus
 mamífero que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se
 expresa en una célula

<400> 15

Ser Asn Asp Val Thr Asp Gly Ile Lys Leu Gln Leu Asp Ala Ser Arg
 1 5 10 15

Gln Cys His Glu Cys Pro Val Leu Gln Gln Lys Val Val Glu Leu Glu
 20 25 30

Lys Gln Ile Ile Met Gln Lys Ser Ile Gln Ser Asp Pro Thr Pro Val
 35 40 45

Ala Leu Gln Pro Leu Leu Ser Gln Leu Arg Glu Leu Ser Ser Glu Val
 50 55 60

Thr Arg Leu Gln Met Glu Leu Ser Arg Ala Gln Ser Leu Asn Ala Gln
 65 70 75 80

ES 2 548 784 B2

Leu Glu Ala Asp Val Lys Ser Ala Gln Ser Cys Ser Leu Asp Met Tyr
85 90 95

Leu Arg His His Thr Cys Ile Asn Gly His Ala Lys Glu Asp Glu Leu
100 105 110

Leu Asp Ala Val Arg Val Ala Pro Asp Val Arg Arg Glu Ile Met Glu
115 120 125

Lys Arg Ser Glu Val Arg Gln Gly Trp Cys Glu Arg Ile Ser Lys Glu
130 135 140

Ala Ala Ala Lys Cys Gln Thr Val Ile Asp Asp Leu Thr Leu Met Ser
145 150 155 160

Gly Lys Gln Ala Gln Glu Ile Thr Glu Leu Arg Asp Ser Ala Glu Lys
165 170 175

Tyr Glu Lys Gln Ile Ala Glu Leu Val Ser Thr Ile Thr Gln Asn Gln
180 185 190

Ile Thr Tyr Gln Gln Glu Leu Gln Ala Leu Val Ala Lys Asn Val Glu
195 200 205

Leu Asp Ala Leu Asn Gln Arg Gln Ala Lys Ser Leu Arg Ile Thr Pro
210 215 220

Ser Leu Leu Ser Ala Thr Pro Ile Asp Ser Val Asp Asp Val Ala Asp
225 230 235 240

Leu Ile Asp Phe Ser Val Pro Thr Asp Glu Leu
245 250

<210> 16

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de la región mínima de la proteína muNS de Orthoreovirus
mamífero que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se
expresa en una célula

<400> 16

Ser Asn Asp Val Thr Asp Gly Ile Lys Leu Gln Leu Asp Ala Ser Arg
1 5 10 15

ES 2 548 784 B2

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

ES 2 548 784 B2

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> sitio de corte de enteroquinasa

 <400> 17

Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> sitio de corte de factor Xa

 <400> 18

Ile Glu Asp Gly Arg
 1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> sitio de corte de trombina

 <400> 19

Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> sitio de corte de proteasa TEV

 <400> 20

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Orthoreovirus aviar

ES 2 548 784 B2

<400> 21

Met Pro Ser Phe Leu Leu Gly Ala Leu Lys Gln Ser Gly Gly Gln Leu
1 5 10 15

Leu Glu His Tyr Arg Cys Asp Ala Ala Asn Arg Tyr Gly Ser Pro Thr
20 25 30

Val Pro Ile Ser His Pro Pro Pro Cys Ser Lys Cys Pro Glu Leu Lys
35 40 45

Glu Gln Ile Ala Lys Leu Ser Ser Ser Pro Ile Pro Lys Val Asp Ser
50 55 60

Ser Val Gly Pro
65

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Orthoreovirus aviar

<400> 22

Pro Ala Ala Leu Leu Ser Lys Ile Ala Asp Leu Gln Arg Ala Asn Arg
1 5 10 15

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

<210> 23

<211> 66

<212> PRT

<213> Orthoreovirus aviar

<400> 23

Glu Asp His Leu Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala
1 5 10 15

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

Ser Ile Ser Ser Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe
35 40 45

Glu Thr Arg Leu Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val
50 55 60

Glu Ala

ES 2 548 784 B2

65

<210> 24
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Orthoreovirus aviar

<400> 24

Arg Val Glu Ala Leu Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Arg Val Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Asp Met Met Thr Gln Ser Leu Gln Tyr Leu Asn Glu Arg Asp Glu
 20 25 30

Leu Leu Gln Glu Val Asp Glu Leu Lys Arg Glu Leu Thr Thr Leu Arg
 35 40 45

Ser Ala Asn Val Arg Leu Asn Ala Asp Asn His Arg Met Ser Arg Ala
 50 55 60

Thr Arg Val
 65

<210> 25
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> variante de la región mínima de la proteína muNS de un
 Orthoreovirus con capacidad de incorporarse a inclusiones
 formadas por una proteína que comprende muNS-Mi de un
 Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando

<220>
 <221> SITE
 <222> (28)..(28)
 <223> cualquier aminoácido excepto Asn

<400> 25

Glu Asp His Leu Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala
 1 5 10 15

Lys Asp His Glu Lys Gly Leu Leu Ala Arg Cys Xaa Val Ser Gly Asp
 20 25 30

Ser Ile Ser Ser Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe
 35 40 45

ES 2 548 784 B2

Glu Thr Arg Leu Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val
50 55 60

Glu Ala
65

<210> 26
<211> 66
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> variante de la región mínima de la proteína muNS de un
Orthoreovirus con capacidad de incorporarse a inclusiones
formadas por una proteína que comprende muNS-Mi de un
Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando

<400> 26

Glu Asp His Leu Leu Ala Tyr Leu Asn Glu His Val Cys Val Asn Ala
1 5 10 15

Lys Asp His Glu Lys Gly Leu Leu Ala Arg Cys Ser Val Ser Gly Asp
20 25 30

Ser Ile Ser Ser Ile Leu Gly Gln Arg Met Lys Asn Arg Glu Arg Phe
35 40 45

Glu Thr Arg Leu Arg His Glu Ala Ser Ala Glu Trp Glu Pro Arg Val
50 55 60

Glu Ala
65

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador Forward

<400> 27
ttggcgcgca aatgccagcc gtactgctgt c

31

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 548 784 B2

<223> cebador Reverse

<400> 28

ttgcggccgc aatcacagat catccacc

28

<210> 29

<211> 43

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para efectuar mutagénesis

<400> 29

gggcctgctc gctcggttga gcgtatctgg tgattcaatc tcc

43

<210> 30

<211> 43

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido para efectuar mutagénesis

<400> 30

ggagattgaa tcaccagata cgctacaacg agcgagcagg ccc

43

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador Forward_VSV

<400> 31

cggctagcat gaagtgctt ttgtacttag c

31

<210> 32

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador Reverse_VSV

<400> 32

cccaagcttg ggagagctct tccaactact gaac

34

<210> 33

<211> 64

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador para añadir adaptador

ES 2 548 784 B2

<400> 33
 gccggaattc cgaaggcaaa ccaatcccaa acccactgct gggcctggat ttgcggccgc 60
 aaat 64

<210> 34
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador para añadir adaptador

<400> 34
 atttgccggcc gcaaattccag gccacagcagt gggtttggga ttggtttgcc ttcggaattc 60
 cggc 64

<210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> sitio de corte de proteasa PreScission

<400> 35
 Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 1 5

<210> 36
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador Forward IC

<400> 36
 ttgcggccgc aagaagatca cttgttggt tatic 34

<210> 37
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador Reverse IC

<400> 37
 gcgtctagat tacgcttcca cacggggttc 30



- ②① N.º solicitud: 201431378
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.09.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2364182 B2 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 26.08.2011, todo el documento.	1-42
Y	WO 2012070008 A2 (INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (IGGEB)) 31.05.2012, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 5.	1-42
Y	HYROYUKI MORI y KOREAKI ITO. "The Sec protein-translocation pathway." Trends in Microbiology (2001) Vol. 9, páginas 494-500. Todo el documento.	1-42
A	BRANDARIZ-NUÑEZ A., MENAYA-VARGAS R., BENAVENTE J. y MARTINEZ-COSTAS J. "A versatile molecular tagging method for targeting proteins to avian reovirus muNS inclusions. Use in protein immobilization and purification." PLoS One. (Noviembre 2010) Vol. 5(11), páginas 1-14. Todo el documento.	1-42

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.10.2015

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/46 (2006.01)

C07K19/00 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

C07K14/14 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.10.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-42	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-42	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2364182 B2 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA)	26.08.2011
D02	WO 2012070008 A2 (INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (IGGEB))	31.05.2012
D03	HYROYUKI MORI y KOREAKI ITO. "The Sec protein-translocation pathway." Trends in Microbiology (2001) Vol. 9, páginas 494-500. Todo el documento.	2001
D04	BRANDARIZ-NUÑEZ A., MENAYA-VARGAS R., BENAVENTE J. y MARTINEZ-COSTAS J. "A versatile molecular tagging method for targeting proteins to avian reovirus muNS inclusions. Use in protein immobilization and purification." PLoS One. (Noviembre 2010) Vol. 5(11), páginas 1-14. Todo el documento.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un péptido señal de la vía secretora en posición N-terminal con respecto a la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus. (reivindicaciones 1-7) y, el polipéptido codificado por dicho nucleótido (reivindicación 8), y el uso de dicho polinucleótido (reivindicaciones 40-42).

La presente solicitud de invención también consiste en un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un péptido señal de la vía secretora en posición N-terminal con respecto a un polipéptido de interés, que puede ser un antígeno viral, bacteriano, fúngico, medioambiental o tumoral, y un tercer componente que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus (reivindicaciones 9-15).

La presente solicitud de invención también consiste en dicha proteína de fusión (reivindicación 16), la célula que comprende cualquiera de los polinucleótidos o proteínas anteriores (reivindicación 17), un kit que comprende los polinucleótidos y la célula (reivindicación 18) y métodos de purificación del polipéptido y proteína de fusión (reivindicaciones 19-30). Por último, la presente solicitud de invención consiste en un método de detección de la interacción del polipéptido y la proteína de fusión (reivindicaciones 31-39).

El documento D01 consiste en la identificación de la región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus aviares, un método de purificación y un método para la detección de la interacción entre dos polipéptidos, basado en la capacidad de algunas regiones de la proteína muNS de incorporarse a las inclusiones, junto con un péptido de interés.

El documento D02 consiste en una patente sobre proteínas recombinantes con una actividad de inactivación selectiva de proteínas diana.

El documento D03 consiste en una publicación sobre la vía de translocación de proteína del citosol a la membrana citoplasmática en procariotas (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un estudio para desarrollar un método de detección de interacciones entre los diferentes dominios de muNS (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).

Las reivindicaciones 1-42 son nuevas a la vista del artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

El documento D01 divulga un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la región mínima de la proteína muNS de un Orthoreovirus que tiene la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula o una variante funcionalmente equivalente de la misma, el polipéptido codificado por dicho polinucleótido y la célula que comprende dicho polinucleótido o polipéptido. Dicho polinucleótido comprende la secuencia SEQ ID NO 11 (ver página 5, líneas 29-32, página 6, líneas 1-5, reivindicaciones 1-3 y SEQ ID NO 1).

El documento D01 también divulga un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende un primer componente que comprende al menos un polipéptido de interés y un segundo polipéptido seleccionado del grupo formado por:

- Un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO 21, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- Un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO 22, o una variante funcionalmente equivalente de la misma;
- Un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO 23, o una variante funcionalmente equivalente de la misma; y
- Un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO 21, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El documento D01 también divulga la proteína de fusión codificada por dicho polinucleótido (ver página 6, líneas 6-25 y 29-32, página 7, líneas 1-4, reivindicaciones 4-7 y SEQ ID NO 1-5).

El documento D01 también divulga un kit que comprende un componente A que comprende el primer polinucleótido mencionado anteriormente y una célula que expresa dicho polinucleótido, y un componente B que comprende el segundo polinucleótido mencionado anteriormente (ver página 7, líneas 5-31, página 8, líneas 1-5 y reivindicaciones 8-9).

Por último, el documento D01 también divulga los métodos de purificación y de detección de los polipéptidos anteriormente mencionados y su uso en medicina (ver páginas 41-93 y reivindicaciones 10-19).

El documento D01 difiere de la presente solicitud de invención en que no divulga la existencia de un componente del polinucleótido que comprende un péptido señal de la vía secretora. Sin embargo, en los documentos D02 y D03 se emplean péptidos señales de la vía secretora (proteína Sec), como la secuencia SEQ ID NO 1 del documento D02, para un mismo fin, el de transportar la proteína al retículo endoplasmático (ver SEQ ID NO 3 y 5 del documento D02 y todo el documento D03). No se indica nada en las reivindicaciones 1-42 que no sea conocimiento común en el transporte de proteínas al retículo endoplasmático de la célula. Por lo tanto la invención que se reivindica en las reivindicaciones 1-42 no se considera que implique actividad inventiva según el artículo 8.1 Ley 11/1986.