

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA  
BIENNI 2001-2003

***Producció d'un inhibidor del VIH-1  
en plantes de tabac i d'arròs***

Memòria presentada per Marc Castellet Llerena per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

el director de tesi

l'autor

el tutor

M<sup>a</sup>Dolors Ludevid Múgica

Marc Castellet Llerena

Albert Ferrer Prats

Barcelona, Juny de 2006



***A la Laura i en Pau***

***Gràcies per el vostre amor,  
comprensió i, sobretot, paciència.***



## AGRAÏMENTS

“Que vols fer la tesi?! Ja n'estàs segur? Són moltes preocupacions i la gent que la fa treballa a vegades el cap de setmana...” D'altres em deien: “Preparat per anar just de calés, les beques no donen per gaire...” El que poca gent em va dir, només alguns que l'estaven fent, és que és una experiència formidable i irrepètible. Quantes coses he après i, sobretot, quantes amistats he fet! Ara, mirant-ho amb una mica de perspectiva, me n'adono que si no fos per tota la gent que ha estat al meu costat, de ben segur que no hagués arribat al final. Per aquest motiu vull agrair a totes les persones que m'han ajudat i que tant m'han ensenyat a nivell professional i personal.

En primer lloc m'agradaria agrair a la Dra. Dolors Ludevid, la Lola, per haver confiat en mi, quan jo era un recent llicenciat una mica desorientat. Per haver-me ensenyat a discutir (en el bon sentit), a pensar i, per sobre de tot, per mostrar-me que els moments difícils es superen amb esforç i motivació. Gràcies per dirigir-me i per escoltar-me.

Però la Lola no està sola, forma part d'un tàndem de color roig. Un tàndem en el que qui pedala darrera, però no per això amb menys força, és la Margarita Torrent. De veritat, Marga, al començament em semblava que m'explotaria el cap quan m'explicaves els clonatges: que rom per aquí, que Klenow per allà, que si fem fosfatasa... Encara al·lucino de com vas fer les construccions de partida d'aquest treball. Gràcies per formar-me i per transmetre aquesta calma menorquina tan teva.

Poc després d'arribar al laboratori vermell va aparèixer una noia bellugadissa, xerraire i molt intel·ligent, Elisabet Gas. En aquests anys ha estat ella, sense cap mena de dubte, la persona amb qui més he conviscut i, com diuen, *el roce hace el cariño*. Què hauria estat de mi sense algú que em respongués a les preguntes més absurdes! “Com es prepara el tiosulfat? Que en tens...?”. A tu, Eli, t'haig d'agrair tantes coses..., no caben aquí. Gràcies per les xerrades els divendres a la tarda, tot posant puntes, per la multitud de vegades que m'has ajudat i per aguantar el teu company de lab, que és una mica *denkfaul*.

Al llarg d'aquests anys ha passat molta gent pel laboratori vermell: postdocs, predocs, *nens* de pràctiques,... De tots ells m'ha quedat un bon record, però hi ha dos persones que m'han marcat especialment, la Sabine i en Pau. A la Sabine li vull agrair tot el que em va ensenyar en els meus primers mesos en el laboratori, quan jo no sabia ni com es feia un *Western*. Ella em va ensenyar a treballar *comme il faut*: ordre, metodologia i, fins i tot, pulcritud. En Pau, però, uns anys més tard, va tirar per terra tota la seva feina. Vinga tubs per aquí, papers per allà, tot amuntegat... Per contra, li dec moltes més coses, tant tècniques com personals: ensenyar-me a fer gradients, agroinfiltracions, deformar cares amb el *Photoshop*, fer eppis-bomba, dir tacos en francès... Gràcies *mon petit chu-chu* pel teu incansable humor, la teva amistat i els teus consells. Espero que seguim fent excursions a la neu.

A la resta de vermells també vull agrair-los el fer-me l'estada al laboratori agradable, i en concret: a la Minu per la seva calma i les bones estones que hem passat repicant calls d'arròs, al Lorenzo (rei de la selva) per les seves riallades i alegria, a la Sílvia per ser la millor ballant l'asereje, a l'Imma pel seu bon humor i dedicació i a *lo Tere* per mostrar-me el departament en els meus inicis.

Fora del vermell, però, hi ha molts altres colors al departament: groc, rosa, verd, taronja, negre, gris, lila, blau,... A tota les persones d'aquests laboratoris, gràcies. Tots (estic pràcticament segur) m'heu donat un cop de mà en algun moment. Gràcies per la vostre amistat i el vostre ajut. M'agradaria agrair de forma especial a en Carles, company dins i fora del departament. A l'Irma (Wendy Jamaica) i a la Núria (Wendy Sue Ellen) per preparar els *fistros* més espectaculars que mai s'han vist. Als *nens* del gris, Enric i Néstor, per les llargues xerrades que hem mantingut. Al Pep per compartir dies d'escalada inoblidables (quan no plovia). Al David, Víctor i Ignacio per agitar l'opinió política del personal. Al Jordi Bou i en Jaume per ser els millors veïns...

Tots els que hem treballat al CID sabem la sort que hem tingut de disposar d'un suport tècnic tan eficaç. La nostra feina no seria possible sense la Maite, la Mina, el Luis, la Carme, el Sami, la Mercè de seqüenciació, la Pepita de l'estabulari, l'Àngel d'imatges, la Mònica de confocal,... Gràcies a tots per ajudar-me i particularment a la Maite, vermella fins a la medul·la, per estar sempre allà, solucionant els problemes i donant-me un cop de mà sempre que ho necessitava. També vull fer una menció especial al creixent servei d'hivernacles: Pilar, Eva, Montse, Leire, César. Pilar, no oblidaré mai les estones que hem passat a la campana posant a punt la transformació d'arròs. Ni tampoc les estones que t'has passat tu sola preparant plantes, repicant, fent medis,... Crec que, entre tots, t'hauríem de fer un monument: a Sta. Pilar patrona del transgènics.

D'altra banda, aquest treball tampoc hagués estat possible si no fos per quatre col·laboracions vitals i molt enriquidores. La primera és amb ERA-Biotech,S.L., amb qui hem treballat conjuntament en la purificació de la proteïna de fusió i moltes altres coses. Blanca, Glòria i Tino, gràcies per ajudar-me a fer extraccions proteiques de litres (amb  $\beta$ ME!!) i innumerables FPLCs. Segurament encara em maleïu els ossos, a mi i al T-20.

Continuant amb purificació, vull agrair a la Txell Teixidó, l'Esther Zurrilla i Josep de l'IRBB-Parc Científic per ensenyar-me a fer anar el HPLC. Gràcies per no fer-me sentir com un bitxo estrany entre químics. Txell, gràcies per la síntesis del T-20, pels MALDI, per l'assessorament... Esther, gràcies per preocupar-te pel meu treball a costa del teu. Josep, perdona per espatllar el HPLC tantes vegades...

Quan vam començar amb l'arròs no sabíem ni com es transformava. Per això va ser especialment important la col·laboració amb el grup del Dr. Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, Montpellier). Gràcies, especialment a Donaldo Meynard per dedicar-nos tant de temps, a mi i a en Jordi Quilis, company de viatges i altres coses... Donaldo, sempre tindrè present el refrany *camaron que se duerme, se lo come el turista*. Encara l'haig de pair... Jordi, hi ha una fotocopiadora que se'n recorda de nosaltres...

Finalment, i ja acabo, m'agradaria remarcat que no s'hauria arribat fins al final d'aquest treball sense la col·laboració del grup del Dr. José Esté (Fundació IRSI-Caixa, HUGTP). Ells van realitzar els assaigs d'activitat del T-20 en el seu laboratori de retrovirologia. Gràcies pel vostre temps i eficiència.

Ben segur que, després de dos pàgines d'agraïments, m'oblido d'algú. Si es així, perdoneu. Els que em coneixeu ja sabreu que la memòria no és el meu fort. Gràcies a tothom, de tot cor. Ara, després de quatre anys, si un dia algú em pregunta: "Que tal és fer la tesi?", jo li respondré: "Fes-la. No te'n penediràs."



# ÍNDEX

<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b><u>1. Producció de proteïnes terapèutiques en plantes</u></b>	<b>3</b>
<b>1.1. Característiques de les plantes com a sistema de producció</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Optimització de l'expressió del transgèn en plantes</b>	<b>4</b>
1.2.1. Promotor i regió 5' no codificant	4
1.2.2. Optimització de la seqüència codificant	6
1.2.3. Regió 3' no codificant	8
1.2.4. Altres factors que afecten l'expressió del transgèn	8
<b>1.3. Direccionament subcel·lular de la proteïna recombinant</b>	<b>9</b>
1.3.1. Glicosilació en plantes	10
<b>1.4. Elecció de l'espècie vegetal per a la producció de proteïnes recombinants</b>	<b>12</b>
1.4.1. Planta amb gran biomassa foliar	12
1.4.2. Plantes per a l'acumulació en llavor	13
1.4.3. Espècies vegetals comestibles	14
<b>1.5. Sistemes de transformació</b>	<b>14</b>
1.5.1. Transformació nuclear	14
1.5.2. Transformació de plastidis	15
1.5.3. Agroinfiltració	16
1.5.4. Vectors virals	16
<b>1.6. Purificació de la proteïna recombinant en plantes</b>	<b>17</b>
<b><u>2. T-20, inhibidor de la fusió del VIH-1</u></b>	<b>21</b>
<b>2.1. El Virus de l'Immunodeficiència Humana (VIH-1)</b>	<b>21</b>
2.1.1. Estructura del VIH-1	23
2.1.2. Cicle vital del VIH-1	23
<b>2.2. Entrada del VIH-1 dins la cèl·lula diana</b>	<b>24</b>
2.2.1. Proteïnes de l'embolcall del VIH-1	24
2.2.2. Procés d'entrada del virus	25
<b>2.3. T-20: estructura i mecanisme d'acció</b>	<b>26</b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>29</b>



<b>ESTRATÈGIA</b>	<b>33</b>
1. Precedents	35
2. Estratègia d'acumulació de T-20 en plantes transformades	37
<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>39</b>
<b>A. <u>Material</u></b>	<b>41</b>
<b>1. Material biològic</b>	<b>41</b>
1.1. Bacteris	41
1.2. Plantes	41
1.3. Animals	41
1.4. Virus	41
<b>2. Plasmidis i oligonucleòtids</b>	<b>41</b>
2.1. Plasmidis	41
2.2. Oligonucleòtids	42
<b>3. Anticossos</b>	<b>42</b>
<b>4. Medis i solucions</b>	<b>42</b>
4.1. Solucions generals	43
4.2. Medis generals	43
<b>B. <u>Mètodes</u></b>	<b>44</b>
<b>1. Tècniques d'anàlisi i manipulació d'àcids nucleics.</b>	<b>44</b>
<b>1.1. Extracció de DNA genòmic en plaques de 96 pous</b>	<b>44</b>
<b>1.2. Extracció de RNA total.</b>	<b>45</b>
<b>1.3. Extracció de DNA plasmídic</b>	<b>45</b>
<b>1.4. Subclonatge de fragments de DNA en plasmidis</b>	<b>46</b>
1.4.1. Reaccions de modificació del DNA	46
1.4.2. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	46
1.4.3. Preparació i transformació de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i>	46
<b>1.5. PCR</b>	<b>47</b>
1.5.1. Amplificació promotor RP5 de DNA genòmic d'arròs	47
1.5.2. Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR	47
<b>1.6. Construccions plasmídiques</b>	<b>47</b>
<b>1.7. Tècniques de transferència i hibridació d'àcids nucleics</b>	<b>49</b>
1.7.1. <i>Southern Blot</i>	49
1.7.2. <i>Northern Blot</i>	51
1.7.3. Obtenció de sondes marcades radioactivament	52

1.7.4. Deshibridació de les membranes	52
<b>1.8. Purificació d'oligonucleòtids en gel desnaturalitzant d'urea</b>	<b>53</b>
<b>2. Transformació de tabac i d'arròs</b>	<b>55</b>
<b>2.1. Obtenció d'<i>Agrobacterium thumefaciens</i> recombinants</b>	<b>55</b>
2.1.1. Preparació de cèl·lules d' <i>A.thumefaciens</i> competents	55
2.1.2. Transformació de cèl·lules competents d' <i>A.thumefaciens</i>	55
<b>2.2. <i>Nicotiana tabacum</i></b>	<b>55</b>
2.2.1. Esterilització de llavors de tabac	55
2.2.2. Germinació i creixement de tabac	56
2.2.3. Agroinfiltració de plàntules de tabac	58
2.2.3. Transformació estable de tabac	60
<b>2.3. <i>Oryza sativa</i></b>	<b>60</b>
2.3.1. Esterilització de llavors d'arròs	60
2.3.2. Germinació i creixement d'arròs	60
2.3.3. Transformació estable d'arròs	60
<b>3. Tècniques d'anàlisi i manipulació de proteïnes</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Extracció de proteïnes de teixits vegetals</b>	<b>64</b>
<b>3.2 Electroforesi en condicions desnaturalitzants</b>	<b>64</b>
3.2.1. Electroforesi SDS-PAGE	64
3.2.2. Electroforesi de Tris-Tricina	65
3.2.3. Electroforesi en dos dimensions	66
<b>3.3. Tinció de gels de poliacrilamida</b>	<b>67</b>
3.3.1. Tinció amb blau de Coomassie	67
3.3.2. Tinció amb nitrat de plata	68
<b>3.4. <i>Western Blot</i></b>	<b>68</b>
3.4.1. Transferència de proteïnes	68
3.4.2. Immunodetecció de proteïnes	69
<b>3.5. ELISA</b>	<b>69</b>
<b>3.6. Obtenció d'un anticòs policlonal contra T-20</b>	<b>70</b>
<b>3.7. Purificació de T-20 a partir de fulles de tabac transgènic</b>	<b>71</b>
3.7.1. Homogeneïtzació i extracció proteica	71
3.7.2. Precipitació selectiva amb sulfat d'amoni	72
3.7.3. Cromatografia de bescanvi aniònic	73
3.7.4. Digestió de Rx3-T20 amb Factor Xa	73
3.7.5. Purificació de T-20 per HPLC preparatiu	73

<b>3.8. Tècniques de localització subcel·lular de proteïnes</b>	<b>75</b>
3.8.1. Fraccionament subcel·lular mitjançant gradients de densitat	75
3.8.2. Immunolocalització al microscopi òptic	76
3.8.3. Immunolocalització al microscopi electrònic	78
<b>3.9. Detecció de l'activitat glucuronidasa (GUS)</b>	<b>79</b>
3.9.1. Tinció històquímica de GUS	79
3.9.2. Determinació de l'activitat GUS en teixits vegetals	80
<b>3.10. Anàlisi de l'activitat i la citotoxicitat del T-20 en cultius cel·lulars</b>	<b>80</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>83</b>
<b><u>Capítol I: Producció de T-20 en plantes de tabac</u></b>	<b>87</b>
<b>1. Acumulació de T-20 en fulles de tabac mitjançant fusió amb dominis de <math>\gamma</math>-zeïna</b>	<b>87</b>
<b>1.1. Disseny de les proteïnes de fusió</b>	<b>87</b>
1.1.1. Optimització de codons de la seqüència del T-20	87
1.1.2. Dominis de $\gamma$ -zeïna fusionats a T-20	88
<b>1.2. Obtenció i cribrellat de línies transgèniques de tabac</b>	<b>90</b>
1.2.1. Cribratge i selecció de línies amb nivells alts d'acumulació de proteïna recombinant	91
1.2.2. Obtenció de línies transgèniques homozigotes	92
<b>1.3. La proteïna de fusió Rx3-T20 proporciona la millor acumulació de T-20 en plantes de tabac, tant en transformació estable com transitòria</b>	<b>95</b>
1.3.1. Transformació transitòria de tabac. Acumulació de T-20 fusionat als dominis Rx3, R3, P4 i X10	95
1.3.2. Transformació estable de tabac. Acumulació de T-20 fusionat als dominis Rx3, R3, P4 i X10	96
<b>1.4. Rx3-T20 és estable en fulles de tabac assecades</b>	<b>99</b>
<b>2. Localització subcellular de les proteïnes de fusió</b>	<b>101</b>
2.1. Experiments de fraccionament subcel·lular	101
2.2. Immunolocalització de la proteïna Rx3-T20	103
<b>3. Purificació de T-20 a partir de plantes de tabac</b>	<b>105</b>
3.1. Homogenització del teixit i extracció proteica	105
3.2. Precipitació selectiva amb sulfat d'amoni	106
3.3. Cromatografia de bescanvi aniònic	108

3.4. Digestió Rx3-T20 amb la proteasa Factor Xa	108
3.5. Purificació de T-20 per HPLC	109
3.6. Validació del T-20 i proteòmica de Rx3	111
<b>4. T-20 de plantes és actiu i no és tòxic en cèl·lules humanes</b>	<b>113</b>
<b>Capítol II: Expressió de T-20 en grans d'arròs</b>	<b>117</b>
<b>1. Estudi de l'activitat del promotor gammaZ en plantes d'arròs</b>	<b>121</b>
1.1. Obtenció de línies transgèniques monocòpia d'arròs	121
1.2. El promotor gammaZ és actiu en el desenvolupament del gra d'arròs	127
1.3. El promotor gammaZ no és específic de gra en arròs	129
<b>2. Acumulació de T-20 en grans d'arròs</b>	<b>131</b>
<b>2.1. Obtenció i cribratge de les línies transgèniques d'arròs</b>	<b>131</b>
2.1.1. Posta a punt de la transformació d'arròs	131
2.1.2. Obtenció de les línies transgèniques d'arròs	132
2.1.3. Cribratge de les línies transgèniques per acumulació de Rx3-T20 en gra madur	133
2.1.4. Cribratge de les línies transgèniques per nombre d'insercions del transgèn	134
<b>2.2. Rx3-T20 s'acumula de forma eficient en grans d'arròs</b>	<b>134</b>
2.2.1. Rx3-T20 és estable durant el desenvolupament del gra	137
2.2.2. El promotor RP5 proporciona una expressió específica en gra	139
<b>2.3. Localització subcel·lular de Rx3-T20 en l'endosperma</b>	<b>139</b>
2.3.1. Experiments de fraccionament subcel·lular	140
2.3.2. Immunolocalització de Rx3-T20 al microscopi electrònic	141
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>143</b>
<b>1. L'expressió en plantes de tabac representa un sistema alternatiu de producció de T-20</b>	<b>145</b>
1.1. Acumulació de les proteïnes de fusió al RE	145
1.2. Localització subcel·lular de la proteïna de fusió Rx3-T20	149
1.3. Rx3-T20 és estable a la dessecació de la fulla de tabac	150
1.4. Purificació de T-20 a partir de fulles de tabac	151
1.5. Activitat antiviral del T-20 purificat de plantes	152

<b>2. Acumulació de T-20 a gra d'arròs</b>	<b>154</b>
2.1. El promotor gammaZ no és específic de gra d'arròs	154
2.2. Expressió a gra d'arròs de Rx3-T20 amb el promotor RP5	155
2.3. Rx3-T20 s'acumula junt amb les prolamines d'arròs en CP-I	156
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>159</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>163</b>

## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

### INTRODUCCIÓ

<b>Taula 1.</b> Comparació de sistemes d'expressió de proteïnes recombinants.	3
<b>Figura 1.</b> Especificitat d'endosperma del promotor <i>Gt-1</i> en blat de moro.	5
<b>Figura 2.</b> Degradació de mRNA causada per la repetició de la seqüència AUUUA.	7
<b>Figura 3.</b> Diferències en els N-glicans de mamífers i plantes.	10
<b>Figura 4.</b> Estratègies actuals per 'humanitzar' <i>in vivo</i> els N-glicans de plantes.	11
<b>Figura 5.</b> Procés general per a la recuperació d'una proteïna recombinant a partir de material vegetal.	19
<b>Figura 6.</b> Estructura del VIH-1.	22
<b>Figura 7.</b> Estructura del genoma del VIH-1.	22
<b>Figura 8.</b> Esquema representatiu del cicle vital del VIH-1.	23
<b>Figura 9.</b> Representació esquemàtica de la glicoproteïna gp41 del VIH-1.	25
<b>Figura 10.</b> Esquema representatiu del procés d'entrada del VIH-1 a la cèl·lula diana.	26
<b>Figura 11.</b> Fórmula estructural i seqüència del T-20.	27

### ESTRATÈGIA

<b>Figura 12.</b> Distribució de $\gamma$ - i $\alpha$ -zeïna en els cossos proteics de blat de moro.	35
<b>Figura 13.</b> Esquema representatiu de l'estructura de la $\gamma$ -zeïna de 27 kD.	36
<b>Figura 14.</b> Localització subcel·lular de mutants de delecció de $\gamma$ -zeïna en fulles d' <i>Arabidopsis</i> .	36
<b>Figura 15.</b> Estratègia d'acumulació de T-20 en plantes.	37

### RESULTATS

#### CAPÍTOL I

<b>Figura 16.</b> Optimització de codons de la seqüència del T-20.	88
<b>Figura 17.</b> Estructura de les proteïnes de fusió expressades en plantes de tabac.	89
<b>Taula 2.</b> Pesos moleculars experimentals i teòrics de les proteïnes de fusió.	91
<b>Figura 18.</b> Detecció d'oligòmers.	91
<b>Figura 19.</b> Cribratge de línies transgèniques de tabac.	92
<b>Taula 3.</b> Segregació del transgen en plantes F1.	94
<b>Figura 20.</b> Optimització de l'agroinfiltració.	95

<b>Figura 21.</b> Acumulació de les proteïnes de fusió en plantes de tabac agroinfiltrades.	96
<b>Figura 22.</b> Acumulació de les proteïnes de fusió en línies transgèniques de tabac.	97
<b>Figura 23.</b> Estabilitat de la proteïna Rx3-T20 a la dessecació.	100
<b>Figura 24.</b> Acumulació Rx3-T20 en fulles seques de la línia Rxt3.31.	100
<b>Figura 25.</b> Localització Rx3-T20 en CP mitjançant fraccionament subcel·lular.	102
<b>Figura 26.</b> Localització de proteïnes de fusió en CP per fraccionament subcel·lular.	103
<b>Figura 27.</b> Immunolocalització Rx3-T20 en fulles de tabac.	104
<b>Figura 28.</b> Esquema del procés de purificació de T-20 a partir de fulles de tabac transgènic.	106
<b>Figura 29.</b> Precipitació de la proteïna Rx3-T20 amb sulfat d'amoni.	107
<b>Figura 30.</b> Purificació Rx3-T20 per cromatografia de bescanvi aniònic.	108
<b>Figura 31.</b> Cinètica de digestió de Rx3-T20 amb Factor Xa.	109
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas d'HPLC de la purificació de T-20.	110
<b>Figura 33.</b> Espectre de Maldi-TOF del T-20 purificat de plantes.	111
<b>Figura 34.</b> Isoformes de Rx3 en electroforesi en dos dimensions.	112
<b>Figura 35.</b> Esquema del test d'activitat antiviral utilitzat.	113
<b>Taula 4.</b> Activitat anti-VIH de T-20 produït a plantes (pT-20) i T-20 sintètic (sT-20).	114
<b>Taula 5.</b> Citotoxicitat del T-20 produït a plantes en cèl·lules MT4.	114

## **CAPÍTOL II**

<b>Figura 36.</b> Esquema dels promotors GluB-1 d'arròs i gammaZ de blat de moro.	122
<b>Figura 37.</b> Transformació estable d'arròs amb gZ-GUS.	122
<b>Figura 38.</b> Percentatge d'integracions de T-DNA en les línies transgèniques gZ-GUS.	123
<b>Figura 39.</b> Anàlisi del nombre d'integracions en les línies transgèniques gZ-GUS.	124
<b>Figura 40.</b> Anàlisi del nombre d'integracions en les línies transgèniques gZ-GUS.	125
<b>Figura 41.</b> Anàlisi de l'integritat del cassette d'expressió gZ-GUS.	126
<b>Figura 42.</b> Activitat GUS en grans madurs de línies transgèniques gZ-GUS.	127
<b>Figura 43.</b> Activitat del promotor gammaZ durant el desenvolupament del gra d'arròs.	128
<b>Figura 44.</b> Expressió de gammaZ en teixits vegetatius d'arròs.	129
<b>Figura 45.</b> Comparació de l'activitat del promotor gammaZ en fulla i gra d'arròs.	129

<b>Figura 46.</b> Construcció plasmídica emprada per a la posta a punt de la transformació d'arròs.	132
<b>Figura 47.</b> Visualització de GFP en plantes d'arròs transgènic.	132
<b>Figura 48.</b> Transformació estable d'arròs amb RP5-Rxt3 i 35S-Rxt3.	133
<b>Figura 49.</b> Cribratge de les línies transgèniques per acumulació de proteïna Rx3-T20.	134
<b>Figura 50.</b> Cribratge de les línies transgèniques per nombre d'integracions de T-DNA.	135
<b>Figura 51.</b> Acumulació de Rx3-T20 en les línies transgèniques d'arròs i tabac.	136
<b>Figura 52.</b> Estabilitat Rx3-T20 durant el desenvolupament del gra en les línies 35S-Rxt3 i RP5-Rxt3.	137
<b>Figura 53.</b> Especificitat de gra del promotor RP5.	138
<b>Figura 54.</b> Cossos proteics en l'endosperma d'arròs.	139
<b>Figura 55.</b> Localització Rx3-T20 en CP mitjançant fraccionament subcel·lular.	141
<b>Figura 56.</b> Localització subcel·lular de Rx3-T20 en talls ultrafins d'endosperma de plantes transgèniques d'arròs.	142
<b>DISCUSSIÓ</b>	
<b>Figura 57.</b> Capacitat d'autoensamblatge del domini repetitu de la $\gamma$ -zeïna.	146
<b>Figura 58.</b> Mecanisme d'agregació proposat per a la proteïna de fusió Rx3-T20 en el RE.	147
<b>Figura 59.</b> Cossos proteics de zeolina.	149
<b>Figura 60.</b> Contaminació de les línies transgèniques amb TMV.	152
<b>Taula 6.</b> El T-20 comercial presenta modificacions en els seus extrems N- i C-terminal.	153





## ABREVIACIONS

<b>%:</b> Tant per cent	<b>g:</b> Força centrífuga relativa (rcf)
<b>2xCaMV35S:</b> Doble promotor 35S del CaMV	<b>g:</b> Grams
<b>35S:</b> Promotor 35S del CaMV	<b>G:</b> Guanina
<b>4-MU:</b> 4-metilumbel·liferona	<b>gammaZ:</b> Gen de la gamma-zeïna
<b>À:</b> Amtrongs	<b>GFP:</b> <i>Green fluorescent protein</i>
<b>β-ME:</b> Beta-Mercaptoetanol	<b>Gt-1 o GluB1:</b> Glutelina-1 d'arròs
<b>µg:</b> Micrograms	<b>GUS:</b> β-Glucuronidasa
<b>A:</b> Adenina	<b>gusA:</b> Gen de la β-glucoronidasa
<b>aa:</b> Aminoàcid	<b>h:</b> Hores
<b>Amp:</b> Ampicil·lina	<b>His-tag:</b> Cua d'hexa-histidines
<b>Amp<sup>R</sup>:</b> Resistència a ampicil·lina	<b>HOPG:</b> <i>Highly ordered pyrolytic graphite</i>
<b>AMV:</b> Virus del mosaic de l'alfalf	<b>HPLC:</b> <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>BiP:</b> <i>Binding protein</i>	<b>HPLC-PDA:</b> <i>HPLC-Photo Diode Array</i>
<b>BSA:</b> Albúmina sèrica bovina	<b>Hyg:</b> Higromicina
<b>c.f.:</b> Concentració final	<b>HygR:</b> Resistència a la higromicina
<b>c/s:</b> Cops per segon	<b>IgG:</b> Immunoglobulina de tipus G
<b>C:</b> Citosina	<b>Kb:</b> Kilobases
<b>CaMV:</b> Virus del Mosaic de la Col·i-flor	<b>kD:</b> Kilodaltons
<b>CC50:</b> Concentració citotòxica 50	<b>KLH:</b> <i>Keyhole limpet hemacyanin</i>
<b>CE50:</b> Concentració efectiva 50	<b>Kn:</b> Kanamicina
<b>cm:</b> Centímetre	<b>Kn<sup>R</sup>:</b> Resistència a kanamicina
<b>CP:</b> Cossos proteics	<b>L:</b> Litre
<b>cpm:</b> Comptes per minut	<b>LTR:</b> <i>Long terminal repeats</i>
<b>cv.:</b> Cultivar	<b>m:</b> Metre
<b>DAF:</b> Dies després de la floració	<b>M:</b> Molar
<b>DEPC:</b> Dietil pirocarbonat	<b>MALDI:</b> <i>Matrix assisted laser desorption /ionization</i>
<b>DNA:</b> Àcid desoxiribonucleic	<b>mg:</b> Milígrams
<b>DO:</b> Densitat òptica	<b>min:</b> Minuts
<b>DTT:</b> Ditiotreitòl	<b>mL:</b> Mililitres
<b>EBA:</b> <i>Expanded bed adsorption</i>	<b>mRNA:</b> RNA missatger
<b>ELISA:</b> <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>mS:</b> Milisiemens
<b>ERAD:</b> <i>ER-associated degradation</i>	<b>MUG:</b> Metilumbel·liferil-β-glucurònid
<b>F<sub>0</sub>:</b> Plantes provinents de la transformació	<b>N:</b> Normalitat
<b>F<sub>1</sub>:</b> Generació 1	<b>ng:</b> Nanògrams
<b>Fig.:</b> Figura	<b>nm:</b> Nanòmetres
<b>FPLC:</b> <i>Fast protein liquid chromatography</i>	<b>nos:</b> Gen de la nopalina sintasa

## Abreviacions

---

<b>O/N:</b> <i>Overnight</i> , 16-24h	<b>TBSV:</b> Virus del enanisme ramificat del tomàquet
<b>°C:</b> Graus centígrads	<b>TD:</b> Treonina deaminasa
<b>ocs:</b> Gen de la octopina sintasa	<b>TEV:</b> Virus del gravat del tabac
<b>p/p:</b> Relació pes/pes	<b>Tip:</b> <i>Tonoplast intrinsic protein</i>
<b>p/v:</b> Relació pes/volum	<b>TL:</b> Regió 5'-UTR de TEV
<b>pb:</b> Parells de bases	<b>TMV:</b> Virus del mosaic del tabac
<b>PCR:</b> Reacció en cadena de la polimerasa	<b>U:</b> Unitats enzimàtiques
<b>pl:</b> Punt isoelèctric	<b>UTR:</b> <i>Untranslated region</i> , regió no codificant
<b>pmols:</b> Picomols	<b>UV:</b> Ultraviolada
<b>Pro:</b> Prolina	<b>v/v:</b> Relació volum/volum
<b>PTS:</b> Proteïna total soluble	<b>V:</b> Volts
<b>PVX:</b> <i>Potato X virus</i> , Virus X de la patata	<b>var.:</b> Varietat
<b>rbcS:</b> Gen de la subunitat petita de la rubisco	<b>VIH-1:</b> Virus de l'immunodeficiència humana 1
<b>RE:</b> Reticle endoplasmàtic	<b>vol.:</b> Volum
<b>RMN:</b> Resonància magnètica nuclear	<b>TL:</b> Regió 5'-UTR de TEV
<b>RNA:</b> Àcid ribonucleic	<b>TMV:</b> Virus del mosaic del tabac
<b>RP5:</b> promotor de la prolamina de 13 kD d'arròs	<b>U:</b> Unitats enzimàtiques
<b>rpm:</b> Revolucions per minut	<b>UTR:</b> <i>Untranslated region</i> , regió no codificant
<b>s:</b> Segons	<b>v/v:</b> Relació volum/volum
<b>SDS:</b> Dodecilsulfat sòdic	<b>V:</b> Volts
<b>SDS-PAGE:</b> Electroforesi en gels desnaturalitzats de poliacrilamida	
<b>T:</b> Timina	
<b>T<sup>a</sup>:</b> Temperatura	
<b>TA:</b> Temperatura ambient	

### Aminoàcids:

<b>F</b> Phe, fenilalanina	<b>S</b> Ser, serina	<b>Y</b> Tyr, tirosina	<b>K</b> Lys, lisina	<b>W</b> Trp, triptòfan
<b>L</b> Leu, leucina	<b>P</b> Pro, prolina	<b>H</b> His, histidina	<b>D</b> Asp, aspàrtic	<b>R</b> Arg, arginina
<b>I</b> Ile, isoleucina	<b>T</b> Thr, treonina	<b>Q</b> Gln, glutamina	<b>E</b> Glu, glutàmic	<b>G</b> Gly, glicina
<b>M</b> Met, metionina	<b>A</b> Ala, alanina	<b>N</b> Asn, asparagina	<b>C</b> Cys, cisteïna	<b>V</b> Val, valina

## ***Introducció***



# 1. Producció de proteïnes terapèutiques en plantes

## 1.1. Característiques de les plantes com a sistema de producció

Les proteïnes són utilitzades de forma rutinària en l'àmbit sanitari com a fàrmacs, vacunes i agents de diagnòstic. A més, la recent seqüenciació del genoma humà ha permès descobrir un gran nombre de dianes terapèutiques, fet que ha creat una creixent demanda en la producció de proteïnes recombinants a escala industrial. Tradicionalment, la producció comercial de proteïnes terapèutiques ha recaigut en sistemes de fermentació i cèl·lules de mamífer (Gerngross i col., 2004, Wurm i col., 2004), però aquests sistemes presenten certs inconvenients a nivell de costos, escalat i seguretat. Així, les plantes han sorgit com un sistema de producció alternatiu de proteïnes recombinants amb avantatges interessants (Taula 1).

Paràmetre	Plantes transgèniques	Bacteris	Llevat	Cèl·lules de mamífer	Animals transgènics
<b>Costos de producció</b>	● Baixos	● Baixos	● Mitjans	● Alts	● Mitjans
<b>Temps de desenvolupament</b>	● Llarg	● Curt	● Mig	● Mig	● Llarg
<b>Escalat</b>	● Fàcil	● Difícil	● Difícil	● Difícil	● Mitjana
<b>Temps d'escalat</b>	● Ràpid	● Ràpid	● Ràpid	● Ràpid	● Lent
<b>Qualitat del producte</b>	● Alta	● Baixa	● Mitjana	● Mitjana	● Alta
<b>Glicosilació</b>	● Correcte?	● Falta	● Incorrecte	● Correcte	● Correcte
<b>Risc de contaminació per patògens humans</b>	● Baix	● Alt	● Baix	● Alt	● Alt
<b>Estandardització</b>	● Difícil	● Fàcil	● Fàcil	● Fàcil	● Difícil
<b>Regulació legislativa</b>	● Alta	● Baixa	● Baixa	● Mitjana	● Alta

**Taula 1. Comparació de sistemes d'expressió de proteïnes recombinants.**

L'avantatge més atractiu que presenten les plantes transgèniques per a la producció és la reducció de costos a escala industrial, sobretot en comparació amb els sistemes d'expressió basats en cèl·lules, en els quals és necessari l'ús de fermentadors i de personal especialitzat. A més, la prolífera producció de llavors de les plantes fa que es pugui escalar la producció fins a 1000 vegades en una sola generació (Schillberg i col., 2005). D'altra banda, el desenvolupament d'un sistema de producció d'una proteïna recombinant en plantes és un procés llarg en comparació

amb altres sistemes transgènics. La preparació de vectors d'expressió, la transformació, la regeneració de plantes transgèniques i l'anàlisi de diferents generacions fan que pugui durar fins a dos anys, depenent de l'espècie vegetal. Tot i això, existeixen una sèrie de sistemes d'expressió transitòria, com l'agroinfiltració o l'ús de vectors virals, que permeten produir de forma ràpida petites quantitats de producte per a la seva validació (Fischer i col., 1999).

El fet que les via metabòlica per a la síntesi de proteïnes estigui conservada entre plantes i animals fa que les plantes siguin un sistema interessant per a la correcta producció de proteïnes terapèutiques humanes. A més, utilitzant les plantes com a sistema de producció es minimitza el risc de contaminació del producte amb patògens humans, seqüències oncogèniques i endotoxines (Commandeur i col., 2003). Per contrapartida, la immaduresa d'aquest sistema de producció i la dependència de factors ambientals fan que sigui difícil garantir la qualitat dels processos mitjançant la estandardització.

## **1.2. Optimització de l'expressió del transgèn en plantes**

Un dels principals reptes en la producció de proteïnes recombinants en plantes és aconseguir nivells d'acumulació elevats. Per aquest motiu és especialment important l'optimització del vector d'expressió per tal d'augmentar l'eficàcia en les diferents etapes de l'expressió del transgèn: transcripció, estabilitat del mRNA i traducció.

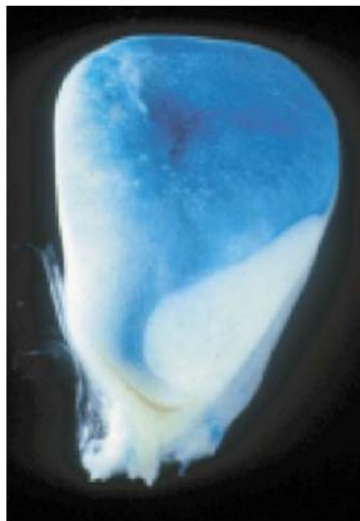
### **1.2.1. Promotor i regió 5' no codificant**

L'elecció del promotor que dirigirà l'expressió del transgèn és el primer punt a tenir en compte a l'hora d'aconseguir nivells alts de transcripció en plantes. A més, el promotor també condicionarà en quin teixit i quan s'expressarà la proteïna recombinant.

Una de les opcions més utilitzades és l'expressió mitjançant promotors constitutius que expressaran la proteïna en la majoria de teixits de la planta. En dicotiledònies, l'elecció més comú és el promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor (CaMV)(O'Dell i col., 1985) o les seves versions modificades que permeten un nivell de transcripció encara major (Kay i col., 1987; Carrington i Freed, 1990). En monocotiledònies, però, el promotor 35S presenta una activitat més baixa, pel que es prefereix utilitzar altres promotors constitutius com el promotor de la ubiquitina-1 de blat de moro (Christensen i Quail, 1996) o el promotor *gos-2* d'arròs (de Pater i col., 1992). Una alternativa per millorar l'eficiència de promotors constitutius de dicotiledònies en monocotiledònies consisteix en l'addició d'un intró normalment en la regió 5' no traduïda. S'ha pogut comprovar que afegint introns tant de gens de monocotiledònies (*Adh1*, *Sh1*, *Ubi1*, *Act1*) com de dicotiledònies (*chsA*) és possible

incrementar l'activitat del promotor CaMV 35S fins a 100 vegades en plantes transgèniques de *Zea mays* i *Poa pratensis* (Vain i col., 1996).

Encara que amb una expressió constitutiva es poden assolir alts nivells d'acumulació de proteïna recombinant, també presenta seriosos inconvenients que poden afectar la viabilitat del sistema de producció. En primer lloc, l'elevada acumulació de la proteïna recombinant en els teixits vegetatius pot afectar negativament tant el creixement i desenvolupament de la planta com altres organismes (herbívors, microorganismes i insectes) que estiguin en contacte amb aquests teixits. També s'ha demostrat que una expressió constitutiva pot estar relacionada amb el silenciament gènic, provocant una disminució o absència d'acumulació de proteïna recombinant (Taylor i col. 1997). Per resoldre aquests inconvenients són especialment interessants els promotors que permeten expressar la proteïna exclusivament en llavor, normalment de cereals (Stoger i col., 2005). A més, l'expressió específica en llavor afavoreix l'estabilitat de la proteïna recombinant permetent emmagatzemar-la llargs períodes de temps sense que es degradi (Daniell, 2001).



**Figura 1. Especificitat d'endosperma del promotor *Gt-1* en blat de moro.** En blau es pot apreciar l'expressió del gen marcador *gusA* que s'ha emprat per visualitzar l'activitat del promotor *Gt-1* en els diferents teixits del gra de blat de moro (Stoger i col., 2005).

En els darrers anys s'han utilitzat diversos promotors específics de llavor, majoritàriament derivats de gens de proteïnes de reserva, per a expressar proteïnes recombinants en diferents parts de la llavor. Un dels més emprats ha estat el promotor *Gt-1* de la glutelina d'arròs que confereix expressió específica a l'endosperma tant en arròs (Yang i col. 2003; Katsube i col., 1999) com en altres cereals (Russell i Fromm., 1997) (Fig.1). Altres exemples de promotors que s'han utilitzat recentment amb èxit per a expressar proteïnes recombinants en llavors de cereals són: el promotor específic d'embrió de la globulina-1 de blat de moro (Hood i col., 2003), el promotor d'endosperma de la globulina-1 d'arròs (Hwang i col., 2002), el promotor específic d'aleurona *Hor3-1* de la D-hordeïna (Horvath i col., 2000) i el promotor *Bx7* de la glutenina de baix pes molecular de blat (Lamacchia i col., 2001). Encara que en la majoria de casos s'escull un promotor endogen de l'espècie vegetal en la qual es vol expressar la proteïna, també s'ha demostrat l'activitat creuada d'alguns promotors



específics de llavor en altres cereals. Un clar exemple és el promotor *Bx7* de blat, el qual també és actiu i específic d'endosperma en ordi (Schunmann i col., 2003) i en arròs (Hwang i col., 2001).

Una altra alternativa interessant la constitueixen els promotors induïbles, ja que l'expressió de la proteïna recombinant pot ser activada just abans de la recollida de la biomassa (Padidam, 2003). La majoria de promotors induïbles que s'han desenvolupat s'activen en resposta a un compost químic com pot ser l'antibiòtic tetraciclina (Shockett i Schatz, 1996), l'esteroid dexametasóna (Samalova i col., 2005), l'etanol (Garoozi i col., 2005), el coure (Segal i col., 2003) o l'insecticida metoxifenoza (Unger i col., 2002). Un altre sistema d'activar l'expressió del transgèn que no requereix cap agent químic, ha estat desenvolupat per científics de l'empresa CropTech ([www.croptech.com.au](http://www.croptech.com.au)) en tabac. Aquest sistema està basat en el promotor de la hidroxil-3-metilglutaril CoA reductasa 2 de tomàquet, que és fortament induït en resposta a un estrès mecànic (Cramer i col., 1999). D'aquesta manera, l'expressió del transgèn s'activa exclusivament durant el processament de les fulles de tabac, provocant l'acumulació de la proteïna recombinant en un període de 8-24 hores. Aquestes estratègies permeten separar la producció de biomassa respecte a la producció de la proteïna recombinant, minimitzant la influència dels factors ambientals en el rendiment d'acumulació i qualitat del producte, i eliminant els possibles efectes nocius de la proteïna expressada en el desenvolupament i creixement de la planta.

L'optimització de l'expressió del transgèn en plantes també ha d'incloure senyals per a un eficient inici de la traducció. Diversos estudis han mostrat que la regió 5' no codificant (5'-UTR) i les seqüències que envolten l'inici de traducció (AUG) tenen un important efecte en l'eficiència de traducció en plantes (Kozziel i col., 1996; Kozak, 1986). La utilització de seqüències 5'-UTR provinents de gens de virus de plantes, particularment de la proteïna de la càpside, és l'opció més emprada ja que permet incrementar notablement l'eficiència de traducció del transgèn. S'ha comprovat que la regió 5'-UTR de la proteïna de càpside del virus del mosaic de l'alfals (AMV) permet incrementar 8 vegades la traducció de mRNA en protoplastes de tabac (Gallie i col., 1989). Resultats similars s'ha pogut obtenir en tabac amb les regions 5'-UTR del virus del mosaic del tabac (TMV) i el virus del gravat del tabac (TEV) (Gallie i col., 1987; Niepel i col., 1999). Tot i així, s'ha de tenir present que l'efecte d'aquestes seqüències pot dependre de l'espècie vegetal, sobretot entre dicotiledònies i monocotiledònies. Així, per exemple, s'ha demostrat que la seqüència 5'-UTR del TMV és menys efectiva en protoplastes de blat de moro que en protoplastes de tabac (Gallie i col., 1989), mentre que succeeix el contrari amb les seqüències 5'-UTR del gen de la PEP-carboxilasa de blat de moro (Hudspeth i col., 1989). Per tant, és convenient tenir en compte l'espècie en què s'expressarà el transgèn per a l'elecció d'una regió 5' no codificant que afavoreixi la traducció i l'estabilitat del transcrit.

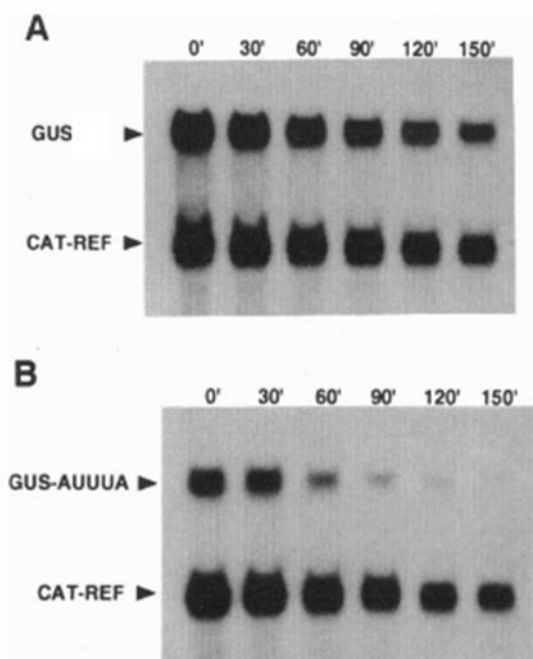
### 1.2.2. Optimització de la seqüència codificant

En la majoria dels casos la proteïna que s'expressa en plantes prové d'organismes heteròlegs com virus, bacteris o mamífers. Les diferències en els mecanismes d'expressió entre aquests organismes, sobretot entre procariotes i

eucariotes, poden provocar una baixa o nul·la expressió de la proteïna salvatge. L'exemple més conegut és el de la proteïna insecticida *Bt* de *Bacillus thuringiensis* en què s'ha pogut comprovar en diversos estudis que el transcrit *salvatge* és incapaç d'acumular-se en plantes fins i tot quan és expressada sota promotors forts (de Maagd i col., 1999). Per aquest motiu cal tenir en compte una sèrie de factors que poden afectar tant l'estabilitat del mRNA com la seva capacitat per traduir-se.

Cada organisme presenta un model d'utilització de codons particular, que provoca en molts casos una ineficient traducció de transcrits de gens heteròlegs (Wada i col., 1992). Les plantes tendeixen a presentar en la tercera base dels seus codons C i G, mentre que en organismes procariotes aquesta posició està ocupada majoritàriament per A i T. Així, si adequem la seqüència del transgèn al model d'utilització de les plantes és possible augmentar la taxa de traducció del transcrit i obtenir nivells més elevats d'acumulació de proteïna. Amb aquesta estratègia Horvath i col. (2000) van aconseguir millorar substancialment l'acumulació d'una glucanasa procariota respecte al gen sense optimitzar. També en el cas de la toxina *Bt* s'ha demostrat que l'adequació de la seqüència al model d'utilització de codons de les plantes permet acumular més proteïna (de Maagd i col., 1999).

Els gens heteròlegs, especialment els provinents de procariotes, poden presentar diverses seqüències riques en A/U que inestabilitzen el mRNA i provoquen la seva degradació (Chen i col., 1995). El cas més estudiat és el del motiu AUUUA que s'ha vist que és capaç de provocar la ràpida degradació de transcrits tant si és present en la regió codificant com en la regió 3' no codificant (Ohme-Takagi i col., 1993; De Rocher i col., 1998). En un estudi realitzat en tabac, la incorporació de 10 motius AUUUA en els transcrits de la  $\beta$ -glucuronidasa (Fig.2) i la globulina s'ha demostrat que



**Figura 2. Degradació de mRNA causada per la repetició de la seqüència AUUUA.** *Northern Blots* de protoplastes de tabac utilitzats per mesurar la degradació del transcrit GUS amb diferents regions 3'-UTR en referència al transcrit control de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT-REF). Es pot observar que el transcrit GUS on s'han incorporat 10 seqüències AUUUA en la regió 3'-UTR (B) es degrada ràpidament en comparació amb el transcrit GUS control (A).

comporta la inestabilitat del transcrits, mentre que si s'incorpora una altra seqüència rica en A/U (AUUAA) no s'observen diferències respecte al transcrit salvatge (Ohme-Takagi i col., 1993). Per tant, sembla que en el mecanisme pel qual un mRNA és degradat ràpidament és més important la presència de determinat motius com AUUUA que el seu contingut en A/U.

Unes altres seqüències que cal eliminar de la regió codificant del transgèn per tal que aquest s'expressi correctament són llocs críptics de *splicing*, senyals prematures de poliadenilació (AATAAA i variants) i seqüències amb capacitat per formar estructures secundàries (de Maagd i col., 1999). Degut a que la mutagènesi dirigida per tal de suprimir tots aquest elements pot ser molt laboriosa, l'opció més emprada per obtenir la seqüència optimitzada d'un transgèn consisteix en la generació d'un gen sintètic per síntesi química d'oligonucleòtids.

### 1.2.3. Regió 3' no codificant

La regió 3' no codificant (3'-UTR) o terminador pot influenciar fortament l'estabilitat del mRNA afectant el nivell d'acumulació de la proteïna expressada (Chan i col., 1998). De la mateixa manera que amb la regió 5'-UTR, les seqüències de poliadenilació més emprades degut a l'estabilitat que ofereixen al transcrit corresponen a gens de virus i bacteris que infecten les plantes, com l'octopina sintasa (*ocs*) i la nopalina sintasa (*nos*) d'*Agrobacterium thumefaciens* o el terminador 35S del CaMV (Koziel i col., 1996). També trobem alguns exemples de seqüències 3'-UTR provinents de gens de plantes que han funcionat eficientment per a expressar proteïnes recombinants, fins i tot millor que els terminadors procariotes. Un exemple és el terminador de la subunitat petita de la rubisco (*rbcS*), amb el qual s'ha vist que permet acumular diverses vegades més mRNA que el terminador *ocs* en plantes transgèniques de tabac (Ingelbrecht i col., 1989). En patata també s'ha comprovat que les seqüències 3' no codificants del gen *vspB* de soja i *pin2* de patata permeten acumular més mRNA que el terminador *nos* expressant l'antigen de superfície de l'hepatitis B (Richter i col., 2000).

### 1.2.4. Altres factors que afecten l'expressió del transgèn

L'expressió del transgèn també es veu influenciada per diversos factors que no poden ser controlats de forma precisa mitjançant el disseny del vector d'expressió i que poden conduir a nivells d'expressió variables del gen d'interès i, fins i tot, a la inactivació completa (Plasterk i col., 2000). Entre aquests factors trobem el lloc d'integració del transgèn, l'estructura del locus transgènic, el nombre de còpies i el silenciament gènic.

S'han desenvolupat diverses estratègies per intentar minimitzar la influència d'alguns d'aquests factors. La més recent consisteix en la utilització de gens virals que permeten suprimir el silenciament gènic (Anandalakshmi i col. 1998). En un sistema de transformació transitòria com l'agroinfiltració, en què el silenciament gènic és més accentuat, s'ha demostrat que la coexpressió del supressor viral p19 del virus del

enanisme ramificat del tomàquet (TBSV) pot incrementar fins a 50 vegades l'expressió del gen d'interès (Voinnet i col., 2003). D'altra banda, en plantes transgèniques també s'ha comprovat que supresors virals poden activar l'expressió de transgens que es trobaven prèviament silencisats (Gelvin i col., 2003).

L'expressió del transgèn en plantes transformades de forma estable està fortament influenciada pel lloc d'integració del DNA recombinant dins el genoma de la planta. La solució més evident per evitar els problemes generats per aquest efecte posicional consisteix en direccionar la integració del transgèn a determinades regions transcripcionalment actives del genoma de la planta. Encara que el direccionament específic del transgèn mitjançant recombinació homòloga s'ha comprovat en múltiples estudis que és altament ineficient (Offringa i col., 1990; Risseeuw i col., 1995), una opció alternativa consisteix en la integració en llocs específics mitjançant el sistema de recombinació *Cre/loxP* (Vergunst i col., 1998). En aquest cas el T-DNA recombinant és dirigit a una localització cromosòmica determinada, on s'ha introduït les seqüències *loxP*, gràcies a l'expressió transitòria de la recombinasa *Cre*. Encara que l'eficiència de recombinació al lloc específic s'ha vist que és baixa (2 %) actualment representa el millor sistema per dirigir la integració del transgèn.

### **1.3. Direccionament subcel·lular de la proteïna recombinant**

La localització subcel·lular de la proteïna recombinant és un factor crític per a la seva estabilitat i, consegüentment, per a la seva acumulació. A més, el compartiment cel·lular on s'acumula afecta significativament a les modificacions post-traducionals i al plegament de la proteïna expressada, contribuint a la seva funcionalitat.

Estudis comparatius de direccionament realitzats amb immunoglobulines i fragments Fv de cadena única han demostrat que la via de secreció és un compartiment més adequat que el citosol per al plegament i assemblatge de cadenes proteiques (Schillberg i col., 1999). D'altra banda, el direccionament d'anticossos a la via de secreció mitjançant pèptids senyals N-terminals permet normalment una acumulació de diversos ordres de magnitud major que l'obtinguda amb una expressió citosòlica. Aquestes millores són degudes principalment a les característiques del reticle endoplasmàtic (RE), que proporciona un ambient oxidant amb abundància de xaperones i poques proteases. Recentment, s'ha demostrat que anticossos direccionats a la via de secreció interactuen específicament amb la xaperona molecular BiP (Nuttall i col., 2002).

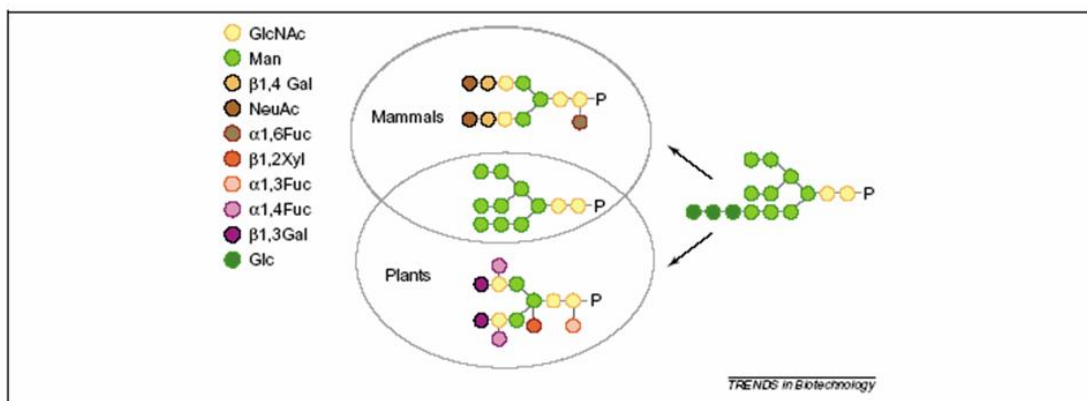
En absència d'informació addicional de direccionament, la proteïna expressada és secretada a l'apoplast. Degut a que l'estabilitat de la proteïna recombinant és molt inferior en l'apoplast que en el lumen del RE, l'addició d'un senyal de retenció al RE pot incrementar significativament l'acumulació de la proteïna recombinant. S'ha demostrat que l'acumulació d'anticossos en el lumen del RE mitjançant el tertrapèptid

K(H)DEL és entre dos i deu vegades superior que sense aquest senyal de retenció (Conrad i col., 1998). En el cas que expressem una glicoproteïna, la retenció al RE fa que no sigui modificada en l'aparell de Golgi, la qual cosa comporta que no s'incorporin glicans amb residus específics de plantes com la fucosa o la xilosa (veure apartat 1.3.1.).

### 1.3.1. Glicosilació en plantes

La via metabòlica per a la síntesi de proteïnes està conservada entre plantes i animals. Això fa que les plantes siguin un sistema interessant per a la correcta producció de proteïnes terapèutiques humanes, sobretot respecte a sistemes d'expressió bacterians, on moltes proteïnes no obtenen el plegament adequat i són degradades o s'acumulen en cossos d'inclusió insolubles. Aquesta habilitat de les plantes queda reflectida en la capacitat de produir anticossos funcionals formats per quatre cadenes polipeptídiques unides covalentment per ponts disulfur (Schillberg i col., 2002).

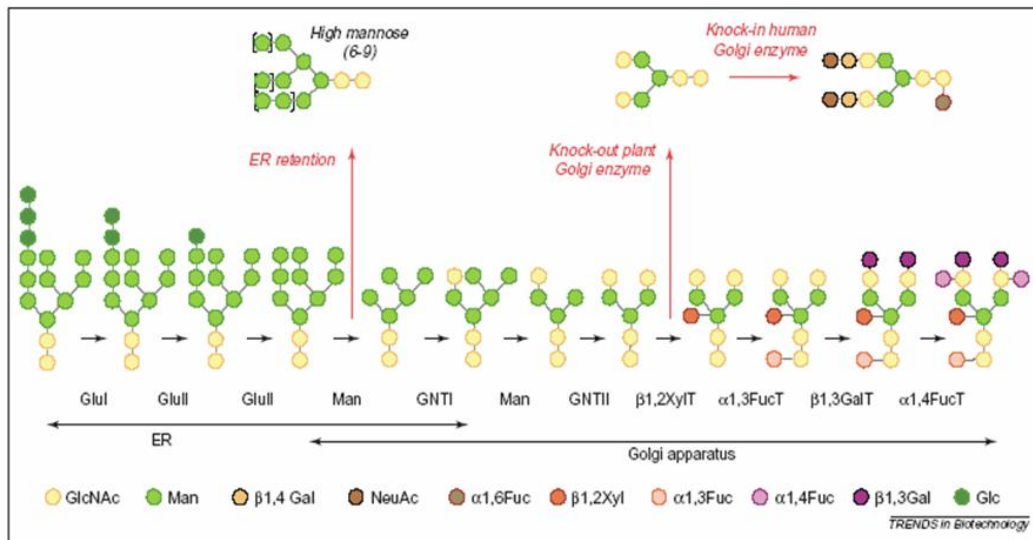
Tot i així, existeixen certes diferències en el seu processament posttraduccional, concretament en la glicosilació (Fig.3). Així, glicoproteïnes humanes produïdes en plantes tendeixen a presentar grups glucídics  $\beta(1\rightarrow2)$ -xilosa i  $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosa no presents en mamífers i els manquen grups terminals de galactosa i àcid siàlic presents en proteïnes humanes (Gomord i col., 2005). A la figura 3 es descriuen amb més detall aquestes diferències de glicosilació entre mamífers i plantes. S'ha de tenir en compte que la composició en glicans pot variar tant entre espècies vegetals com en diferents teixits d'una mateixa planta.



**Figura 3. Diferències en els N-glicans de mamífers i plantes.** En plantes i mamífers existeixen principalment dos classes de N-glicans sintetitzats a partir del mateix precursor. El primer tipus són els glicans amb alt contingut de manosa i estan presents tant a plantes com a mamífers. La seva estructura està formada per dos molècules de N-acetilglucosamida (GlcNAc) i entre 5 i 9 residus de manosa (Man). La segona classe està formada per N-glicans més complexes, produïts per la incorporació de diferents residus glucídics mitjançant glicosiltransferases, algunes de les quals són específiques de l'organisme. En plantes s'incorpora a la N-acetilglucosamida de l'arrel una  $\alpha(1,3)$  fucosa ( $\alpha(1,3)$  fuc), mentre que en mamífers és una  $\alpha(1,6)$  fucosa ( $\alpha(1,6)$  fuc). A més, a la manosa central dels glicans de plantes s'uneix una  $\beta(1,2)$  Xylosa ( $\beta(1,2)$  Xyl). També es troben diferències en els extrems dels glicans. Així, en plantes s'uneixen residus de  $\beta(1,3)$  galactosa ( $\beta(1,3)$  Gal) i  $\alpha(1,4)$  fucosa ( $\alpha(1,4)$  fuc) a la N-acetilglucosamida terminal, mentre que en mamífers son residus de  $\beta(1,4)$  galactosa ( $\beta(1,4)$  Gal) i àcid siàlic (NeuAc).

Encara que les diferències en l'estructura de glicans siguin mínimes, s'ha demostrat que, en altres sistemes d'expressió, poden afectar l'estructura i la funcionalitat de la glicoproteïna recombinant. A més, existeixen diferents estudis que demostren la immunogenicitat dels glicans de plantes administrats per via parenteral en diferents mamífers (Bardor i col., 2003; Faye i col., 2005). Tot i així, el seu efecte en humans està per demostrar.

Per intentar solucionar aquest problema i *humanitzar* les glicoproteïnes produïdes en plantes, s'han utilitzat diferents aproximacions (Fig.4). La primera consisteix en la modificació *in vitro* de la proteïna recombinant mitjançant  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa i sialiltransferasa purificades d'humans (Blixt i col., 2002). Una altra aproximació més elegant consisteix en expressar en plantes la  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa humana per tal de produir anticossos recombinants amb galactosa en les seves cadenes glucídiques (Bakker i col., 2001). La sialització *in vivo* és més difícil d'aconseguir perquè les plantes no tenen els precursors metabòlics per produir aquest grup. És necessari, per tant, introduir diferents enzims per constituir tota la via metabòlica. En aquestes aproximacions s'incorporen els residus glucídics que no són presents de forma natural a les plantes. Encara manca, però, eliminar els grups específics de plantes i no desitjats (fucosa i xilosa). Per assolir aquest objectiu, l'estratègia d'alguns laboratoris és inhibir els enzims fucosiltransferasa i xililtransferasa mitjançant anticossos, ribozimes o RNA d'interferència (Twyman i col., 2003). Una altra opció, és la retenció de la proteïna expressada en el reticle endoplasmàtic impedit l'actuació de les glicosiltransferases específiques de plantes de l'aparell de Golgi (Sriraman i col., 2004). Tot i que l'obtenció de productes recombinants funcionals i idèntics als originals és un repte en aquest camp, existeix una controvèrsia respecte a si els glicans de plantes podrien ser immunogènics o no en humans.



**Figura 4. Estratègies actuals per 'humanitzar' *in vivo* els N-glicans de plantes.** Existeixen dos possibilitats per produir proteïnes terapèutiques sense N-glicans específics de plantes. La primera consisteix en la retenció en el reticle endoplasmàtic de la proteïna, evitant la intervenció de les glicosiltransferases de l'aparell de Golgi. La segona es basa en l'obtenció de plantes *knock-out* per la  $\beta(1,2)$  xililtransferasa i  $\alpha(1,3)$  fucosiltransferasa. Per tal d'*humanitzar* els glicans de plantes *in vivo* és necessari produir plantes *knock-in* pels gens de les glicosiltransferases del Golgi humà. L'obtenció de residus  $\beta(1,4)$  galactosa és relativament senzilla ja que només es necessita la introducció d'un gen, mentre que per a la síntesis d'àcid siàlic fa falta l'expressió simultània de diversos enzims.

### 1.4. Elecció de l'espècie vegetal per a la producció de proteïnes recombinants

#### 1.4.1. Planta amb gran biomassa foliar

El tabac és la planta model per excel·lència per a la producció de proteïnes recombinants, essent la més utilitzada sobretot a escala de laboratori. L'existència d'una tecnologia ben establerta per a la seva transformació, la gran producció de biomassa, la prolífica producció de llavors i l'existència d'una infraestructura de processament a gran escala són els principals avantatges del tabac com a planta productora (Ma i col. 2003). Un altre avantatge important és que es tracta d'un cultiu no comestible que difícilment contaminarà la cadena alimentària. Encara que la gran producció de biomassa en forma de fulles (fins a 100.000 Kg/hectàrea) sembli un benefici clar, també comporta inconvenients a nivell industrial. Com que la proteïna es sintetitza en un ambient aquós, susceptible de ser degradada, es fa necessari un processament immediat o la congelació del material, augmentant consegüentment el cost de producció (Fischer i col., 2000). Si es tracta d'una proteïna molt estable que resisteixi la deshidratació, les fulles es poden assecar disminuint el volum de material a processar i permetent emmagatzemar la proteïna expressada abans de la seva purificació. Un altre inconvenient del tabac relacionat amb el processament és l'alt contingut en alcaloides que són alliberats en l'extracció de la proteïna i que dificulten el procés de purificació (Nikolov i col., 2004). Per tal de minimitzar aquest problema actualment es disposa de varietats de tabac amb baix contingut d'alcaloides (Fischer i col. 2004).

Tanmateix existeixen altres cultius amb gran biomassa foliar que s'utilitzen per a l'expressió de proteïnes terapèutiques. L'alfals i la soja tenen l'avantatge de ser espècies fixadores de nitrogen atmosfèric i redueixen els costos en fertilitzants químics. Especialment interessant és l'alfals, sistema vegetal emprat per l'empresa canadense Medicago (<http://www.medicago.com>), perquè produeix gran quantitat de biomassa seca amb un alt contingut de proteïna en fulla i es pot recollir nou vegades per any (Khouidi i col., 1999). A més, un important avantatge de l'alfals per a la producció de proteïnes terapèutiques és que les glicoproteïnes sintetitzades en fulla tendeixen a presentar estructures de glicans homogènies i que, a diferència de la resta de plantes, l'alfals conté la maquinària necessària per a la incorporació d'àcid siàlic (Shah i col., 2003). En aquesta espècie s'han aconseguit acumulacions del 1% de proteïna total soluble per a l'anticòs C5-1 i fins al 3% per a la  $\beta$ -glucuronidasa (Khouidi i col., 1999).

Recentment, s'ha descrit que una altra planta del mateix gènere, la lleguminosa *Medicago truncatula*, ofereix encara més avantatges (Abranches i col. 2005). Primer de tot, al ser una espècie model dins la família de les lleguminoses s'han invertit molts esforços en caracteritzar el seu genoma i en desenvolupar eines genòmiques. *Medicago truncatula*, és una espècie autògama que ofereix més seguretat ambiental que l'alfals, que és al·lògama. Altres factors que fan de *M. truncatula* una espècie

atractiva per a la producció de proteïnes recombinants són la gran producció de biomassa i un cicle de vida curt.

#### **1.4.2. Plantes per a l'acumulació en llavor**

L'expressió de la proteïna recombinant en llavor aporta diferents beneficis al sistema de producció pel que fa a estabilitat de la proteïna, seguretat biològica, emmagatzematge i purificació del producte (Stoger i col., 2005). Tot i així, per obtenir llavors és necessari completar el cicle de floració, mentre que en els cultius vegetals en els que la proteïna recombinant s'acumula a la biomassa foliar, es poden recollir abans, eliminant l'alliberació de pol·len i el possible flux de transgens. Actualment s'estan utilitzant principalment quatre espècies de cereals (blat de moro, arròs, civada i blat) i dos espècies de llegums (soja i pèsol) per a la producció específica en llavor de proteïnes recombinants.

El blat de moro és el cereal més avançat en la producció comercial de proteïnes terapèutiques i és l'aposta de futur d'empreses com Prodigene (<http://www.prodigene.com>) i Meristem Therapeutics (<http://www.meristem-therapeutics.com>). Aquest cereal s'ha utilitzat per a la producció comercial d'avidina i  $\beta$ -glucuronidasa i s'està investigant per a la producció d'enzims com la lacasa, la tripsina o la aprotinina (Hood i col., 1997; Witcher i col., 1998). Entre els cereals, el blat de moro presenta la producció anual de gra més elevada, un alt contingut proteic en llavors i un interval de generació curt. Aquestes característiques fan que pugui proporcionar el major rendiment de proteïna recombinant per hectàrea cultivada respecte a altres cereals (Stoger i col., 2005). Un potencial desavantatge del blat de moro, però, és que és una espècie amb pol·linització creuada, fet que implica majors mesures de contenció (Commandeur i col., 2003).

Entre els altres cereals, l'arròs presenta diversos avantatges comuns amb el blat de moro: a) l'alta producció de biomassa en forma de gra, b) la facilitat de transformació i manipulació en el laboratori, i c) la capacitat d'escalat ràpid. A més, és una espècie que s'autopol·linitza i pot ser cultivada en hivernacles en els primers estadis de la producció (Stoger i col., 2005). La civada, encara que té un rendiment menor de gra, presenta l'avantatge d'un baix cost de producció i un alt contingut proteic en llavor. Algunes proteïnes s'han expressat en grans de civada amb nivells d'acumulació elevats, com un anticòs contra el VIH-1 que representava 150  $\mu$ g/g de llavor (Schunmann i col., 2002) o una cel·lulasa recombinant que s'acumulava fins a representar el 1,5% de la proteïna total soluble (Xue i col., 2003). Aquestes dues espècies, arròs i civada, constitueixen actualment la plataforma tecnològica de producció de diverses empreses com Ventria Bioscience Inc. ([www.ventria.com](http://www.ventria.com)) o ORF Genetics ([www.orf-genetics.com](http://www.orf-genetics.com)). El blat, d'altra banda, s'ha utilitzat poques vegades per a l'expressió de proteïnes terapèutiques degut al baix nivell d'acumulació de proteïna recombinant observat en diversos casos (Stoger i col., 2002). Malgrat això, el desenvolupament de cassettes d'expressió més eficients pot incrementar l'atractiu d'aquest cereal, que presenta el cost més baix de producció.



L'expressió específica de proteïnes recombinants en llavor també s'ha explorat en llegums, principalment soja i pèsol, que tenen l'avantatge de presentar un contingut proteic en llavor molt elevat (>40 %). La dificultat de transformació i la baixa producció anual de gra són els principals inconvenients d'aquest sistema. En pèsol s'ha expressat únicament fragments scFv d'anticossos amb nivells d'acumulació en llavor de fins el 2% de proteïna total soluble (Perrin i col., 2000; Saalbach i col., 2001). En soja, l'únic exemple de proteïna terapèutica que s'ha expressat específicament en gra és la caseïna, utilitzant el cassette d'expressió de la lectina (Philip i col., 2001).

### 1.4.3. Espècies vegetals comestibles

El principal avantatge d'expressar la proteïna en fruites o verdures és que les parts comestibles de la planta poden ser consumides crues o semiprocessades, representant un sistema ideal per a la producció de vacunes i anticossos d'aplicació tòpica. La patata és l'espècie més utilitzada per a la producció de vacunes com l'antigen de superfície de l'hepatitis B o la proteïna de càpside del rotavirus VP6 (Richter i col., 2000; Yu i col., 2003). També s'han utilitzat patates per expressar anticossos, glucanases o proteïnes de llet humana (Artsaenko i col., 1998; Chong i col., 1997; Chong i col., 2000). Els tomàquets, d'altra banda, tenen l'avantatge de produir gran quantitat de biomassa dins d'hivernacles, augmentant la seguretat biològica del sistema (McGarvey i col., 1995).

## 1.5. Sistemes de transformació

### 1.5.1. Transformació nuclear

Existeixen bàsicament dos metodologies per generar plantes transgèniques en les quals el DNA recombinant estigui integrat en el genoma de la planta: la transformació mitjançant *Agrobacterium tumefaciens* i el bombardeig amb partícules recobertes amb DNA recombinant. La primera s'utilitza principalment en dicotiledònies mentre que el bombardeig s'utilitza sobretot en monocotiledònies, on la transformació via *A. tumefaciens* només s'ha desenvolupat per a algunes varietats model (Ma i col., 2003; Hiei i col., 1997). Recentment, s'ha investigat la utilització d'altres bacteris per a la transferència de gens a plantes. Broothaerts i col (2005), de l'organització australiana CAMBIA ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)), han desenvolupat la transferència de gens a plantes d'arròs, tabac i *Arabidopsis* per via dels bacteris *Rhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium*, encara que amb una eficiència més baixa.

El principal inconvenient de la generació de plantes transgèniques mitjançant transformació nuclear és que és un procés llarg, que pot durar entre unes quantes setmanes fins a mesos depenent de l'espècie vegetal. Un altre problema associat a aquestes metodologies de transformació és que poden comportar la introducció de seqüències de DNA supèrflues en el genoma nuclear. En el cas de la transformació via

*Agrobacterium*, normalment és deguda a un processament poc eficient de les seqüències límit del T-DNA que en molts casos resulta en la transferència de seqüències flanquejants del vector o fins i tot del plasmidi sencer (Martineau i col., 1994). En el cas del bombardeig, la transferència de DNA superflu es deu a que normalment s'utilitza el plasmidi sencer per recobrir els microprojectils (Christou i col., 1996). Conseqüentment, s'han desenvolupat diferents tecnologies per evitar la transferència de seqüències de vectors. La incorporació del gen de la *barnasa* fora dels límits del T-DNA del plasmidi és una aproximació emprada per a la transformació mitjançant *Agrobacterium*, ja que l'expressió d'aquest gen és letal per a les cèl·lules vegetals, impedint que proliferin aquelles en què s'ha integrat part del vector (Hanson i col., 1999). Tanmateix, dins el T-DNA també trobem seqüències no relacionades amb l'expressió de la proteïna recombinant com és el gen de selecció en plantes. Per a la escissió d'aquestes seqüències, s'ha desenvolupat una tecnologia basada en el sistema de recombinació *Cre/loxP*, en el qual el gen de selecció i el gen de la recombinasa *cre* estan situats entre dos seqüències de recombinació *loxP* dins el T-DNA (Bayley i col., 1992). D'aquesta manera, una vegada s'ha generat la planta transgènica, la seqüència situada entre les regions *loxP* pot ser escindida mitjançant l'expressió de la recombinasa que es troba sota un promotor induïble, sigui per un agent químic (Zuo i col. 2001) o per xoc de calor (Wang i col. 2005). En el cas de la transformació per bombardeig, per eliminar les seqüències de DNA supèrflues l'opció més senzilla consisteix en unir als microprojectils únicament el cassette d'expressió en comptes del plasmidi sencer (Breitler i col., 2002).

### 1.5.2. Transformació de plastidis

El gen que codifica per a la proteïna d'interès també pot ser integrat de forma estable en el cromosoma dels plastidis (Maliga i col., 2002; Daniell i col., 2002). El mètode més emprat per a la transformació de plastidis és el bombardeig del teixit vegetal amb el vector d'expressió (Boynnton i col., 1988), encara que també s'han desenvolupat altres metodologies com la transformació amb polietilenglicol (O'Neill i col., 1993) o la transformació per microinjecció (Knoblauch i col., 1999). En tots els casos la integració del DNA recombinant en el cromosoma del plastidi s'aconsegueix mitjançant recombinació homòloga, pel que el transgèn ha d'estar situat entre seqüències homòlogues al genoma del plastidi.

Els avantatges que ofereix aquest sistema de transformació per a la producció de proteïnes terapèutiques són múltiples. Les cèl·lules vegetals poden contenir un centenar de plastidis amb unes 100 còpies de genoma idèntiques cadascun, fet que comporta que el transgèn estigui en un alt nombre de còpies i es puguin obtenir nivells d'acumulació de la proteïna expressada molt elevats, de vegades superiors al 25% de la proteïna total soluble (Tregoning i col., 2003). D'altra banda, a l'expressar-se la proteïna en un òrgan d'origen simbiòtic bacterià, no es produeix silenciament gènic, es poden expressar diversos gens alhora en operons i es limita la possible toxicitat de la proteïna per a la planta productora. Tot i així, el principal atractiu de la transformació de plastidis és que l'herència del transgèn es produeix per via materna i no es transmet amb el pol·len, evitant-se la dispersió del transgèn. Tanmateix, l'origen

bacterià dels plastidis també pot representar un inconvenient ja que no són capaços de produir certes modificacions post-traduccionals com la glicosilació, i que algunes proteïnes poden formar cossos d'inclusió, essent necessari el seu replegament durant la purificació (Daniell i col., 2002).

Aquesta tecnologia ha estat principalment desenvolupada en cloroplastes de tabac per l'empresa Chlorogen ([www.chlorogen.com](http://www.chlorogen.com)), encara que també existeixen altres espècies en les que la transformació plastídica ha funcionat amb èxit, com la pastanaga (Malliga i col., 2002) i el tomàquet (Daniell i col., 2002). Alguns exemples de proteïnes terapèutiques que s'han expressat en cloroplastes de tabac són: l'hormona de creixement humana a un nivell d'acumulació del 8% de proteïna total soluble (PTS) (Staub i col., 2000), l'albumina humana al 11% de PTS (Millan i col., 2003), fragments de toxina tetànica i colèrica al 25% de PTS (Daniell i col., 2001; Tregoning i col., 2003), i una xilanasa termoestable al 6% de PTS (Leelavathi i col., 2003).

### 1.5.3. Agroinfiltració

L'agroinfiltració és un sistema de transformació transitòria que normalment s'utilitza per comprovar l'eficàcia dels vectors d'expressió, encara que en alguns casos s'ha emprat per a la producció de proteïnes recombinants (Fischer i col., 1999). En aquest sistema, l'agrobacteri recombinant que transporta el vector d'expressió és introduït dins el teixit de la fulla mitjançant infiltració en condicions de buit o per injecció directa. Les proteïnes del bacteri catalitzen la transferència del T-DNA recombinant al nucli de la cèl·lula hoste on el transgèn es transcriurà sense integrar-se en el genoma (An i col., 1985; Kapila i col., 1996). Al cap d'uns 3-4 dies es pot detectar la màxima acumulació de la proteïna recombinant, que decau ràpidament degut al silenciament gènic post-traducciona (Johansen i Carrington, 2001).

A diferència de la transformació amb vectors virals, l'agroinfiltració no produeix l'expressió sistèmica del transgèn, que només és expressat en les cèl·lules agroinfiltrades. Aquest sistema, però, permet la utilització de transgens llargs (>2 Kb) que són genèticament inestables en vectors virals (Porta i col., 1996). Un altre avantatge de l'agroinfiltració és que es poden coexpressar diversos transgens en una mateixa cèl·lula simplement barrejant els diferents cultius d'*Agrobacterium* recombinants abans de la infiltració (Kapila i col., 1996). D'aquesta manera s'han pogut produir anticossos funcionals contra l'antigen carcinoembrionàric coexpressant les cadenes pesada i lleugera en dos vectors diferents (Vaquero i col., 1999).

### 1.5.4. Vectors virals

Un altre sistema de transformació transitòria consisteix en la infecció de plantes amb virus recombinants on s'ha introduït el gen d'interès, normalment derivats del virus del mosaic de tabac (TMV) o del virus X de patata (PVX) (Fischer i col., 1999). Els principals avantatges d'aquest sistema de transformació són la rapidesa amb la qual es pot obtenir el primer lot de producte, els alts nivells d'acumulació de proteïna recombinant provocats per la propagació sistèmica del virus i la possibilitat d'expressar

diversos gens infectant les plantes amb diferents virus recombinants. Tot i així, la capacitat d'alguns virus per infectar altres plantes fins i tot d'espècies diferents, fa que siguin necessàries mesures addicionals de contenció per evitar la dispersió del transgèn.

Existeixen tres estratègies diferents per a la inserció del transgèn en el genoma viral: (1) reemplaçar un gen viral no essencial pel gen d'interès, (2) afegir el transgèn sota un promotor subgenòmic fort o (3) fusionar-lo amb un gen viral. Ateses les limitacions de mida dels genomes virals, l'opció més comuna és la primera, en la que el transgèn s'introdueix normalment substituint la proteïna de la càpside.

Recentment, l'empresa alemanya Icon Genetics ([www.icongenetics.com](http://www.icongenetics.com)) ha desenvolupat una tecnologia anomenada *magnifectio* que combina els avantatges de l'expressió amb virus recombinants i la capacitat de transferència del transgèn d'*Agrobacterium* (Gleba i col., 2005). En aquest sistema, el genoma del virus recombinant és clonat dins el T-DNA d'un vector binari i s'aprofita la capacitat de transferència d'*Agrobacterium* per infectar plantes adultes mitjançant infiltració en condicions de buit (Marillonnet i col., 2005). Degut a que el gen d'interès és introduït en el genoma del TMV substituint la proteïna de càpside *MP*, no es permet la formació de partícules víriques i s'impedeix que el virus pugui infectar altres plantes, augmentant la seguretat biològica del sistema. D'altra banda, a l'eliminar la capacitat de moviment sistèmic del virus es redueixen les limitacions pel que fa a la mida del transgèn.

El principal problema d'aquesta tecnologia és que la formació de replicons actius a partir del transcrit nuclear no és gaire eficient. Aquest fet es deu a que el TMV no presenta de forma natural una fase nuclear i que, consegüentment, el seus transcrits no estan preparats per al processament i transport nuclear. Marillonnet i col. (2005) van resoldre aquest problema modificant el genoma del virus recombinant en dos sentits: (1) introduint mutacions silencioses per tal d'eliminar llocs crítics de *splicing* i (2) afegint introns vegetals per tal de que els transcrits fossin reconeguts més fàcilment per la maquinària de processament i exportació de RNA nuclears. Amb aquestes modificacions es va aconseguir que el percentatge de cèl·lules que replicaven el virus passés del 1,6% al 90% i que la quantitat d'agrobacteris necessaris per iniciar la infecció es reduís unes 1000 vegades. Aquestes millores han fet que *magnifectio* sigui actualment la tecnologia que permet acumular més quantitat de proteïna recombinant en plantes, en alguns casos fins al 80% de proteïna total soluble (Gleba i col., 2005).

## **1.6. Purificació de la proteïna recombinant en plantes**

La purificació de la proteïna recombinant a partir de teixit vegetal és l'etapa que genera més costos en un sistema de producció basat en plantes transgèniques. Un exemple n'és la producció de  $\beta$ -glucuronidasa en plantes transgèniques de blat de moro, on s'ha estimat que el 94% dels costos de producció anuals són deguts al

fraccionament de les llavors (6%), extracció de proteïna (40%) i purificació (48%) (Evangelista i col., 1998). Conseqüentment, per tal que el sistema sigui comercialment viable és necessari desenvolupar un procés de purificació barat, que pugui ser escalat i que permeti preservar la funcionalitat de la proteïna d'interès.

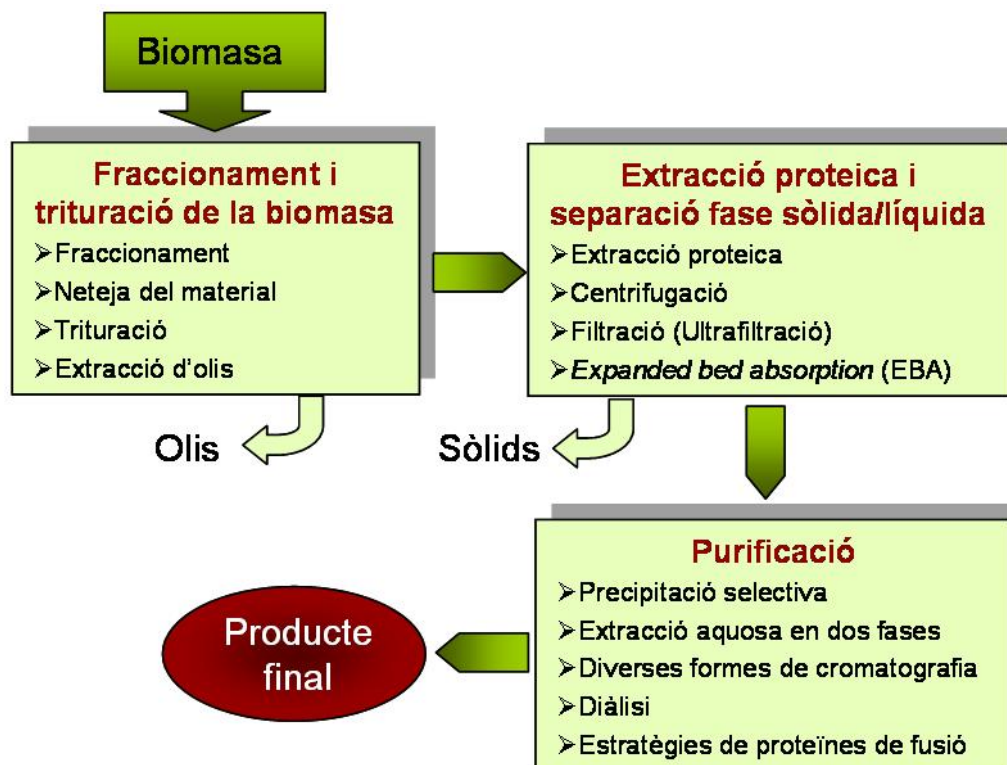
Les plantes contenen una particular matriu de contaminants (proteïnes, olis, compostos fenòlics, etc) que han de ser eliminats durant la purificació de la proteïna recombinant. Els compostos fenòlics, molt abundants en fulles de tabac, són particularment molestos ja que poden formar complexos amb la proteïna recombinant durant l'extracció aquosa i interfereixen en els processos de purificació, sobretot quan s'utilitzen mètodes cromatogràfics (Kusnadi i col., 1998). A més, els residus sòlids de les plantes són generalment més abundants, més densos i de mida més gran que els residus cel·lulars provinents de bacteris o cèl·lules de mamífer. Això fa que en la purificació de proteïnes a partir de biomassa vegetal (excepte en el cas de cultius cel·lulars vegetals) les etapes de fraccionament i trituració abans de l'extracció tinguin una importància especial. Un altre factor rellevant és l'espècie vegetal en la qual s'està expressant la proteïna recombinant, ja que afecta no només els mètodes de processament sinó també els compostos contaminants que cal eliminar durant la purificació. En tabac, per exemple, la presència d'alcaloides tòxics fa necessària una alta puresa del producte final (Moleney i col., 1995). D'altra banda, la purificació a partir de grans d'arròs es veu beneficiada per la presència d'inhibidors de proteases que proporcionen estabilitat a la proteïna recombinant durant l'extracció (Menkhaus i col., 2004).

Les etapes de processament de la biomassa transgènica fins a l'obtenció de la proteïna recombinant pura es poden dividir en tres parts: (1) fraccionament i trituració de la biomassa, (2) extracció de la proteïna i separació de les fases sòlida/líquida i (3) purificació de la proteïna recombinant. La figura 5 recull les principals operacions emprades en les diferents parts del processament. En general, l'ús final de la proteïna heteròloga, l'espècie de producció i el teixit on s'expressa la proteïna recombinant marquen la necessitat de cadascuna d'aquestes etapes. Un exemple de processament mínim és la producció de vacunes en plantes comestibles, en què la proteïna pot ser administrada com a material cru. D'altra banda, si el que produïm és una proteïna terapèutica d'aplicació parenteral per a humans, la purificació inclourà múltiples passos per tal d'assolir el nivell de puresa requerit (95-98 %)(Headon i Walsh, 1994). A més serà necessari demostrar que el producte final no conté pesticides o altres agents citotòxics i que està lliure de contaminació microbiològica (Miele i col., 1997).

El primer pas en el processament és el fraccionament i trituració, i té com a principal objectiu reduir el volum de biomassa i preparar-la per a l'extracció proteica. En primer lloc s'ha d'aïllar el teixit on s'ha expressat la proteïna recombinant, sigui l'endosperma de la llavor, l'embrió o la fulla en el cas del tabac. A continuació, després de netejar i condicionar el material, aquest es tritura per reduir la mida de les partícules. Per a espècies que contenen molta quantitat d'olis naturals, en aquesta etapa també s'inclou normalment una extracció d'olis amb hexans (Bai i col., 2002).

La segona etapa, l'extracció proteica, té com a missió solubilitzar la proteïna recombinant del material vegetal en un medi aquós que permeti la posterior purificació.

La composició del tampó d'extracció (pH, detergents, sals, inhibidors de proteases, etc.) és el primer punt a tenir en compte, ja que determina tant la capacitat de solubilització de la proteïna recombinant com de la resta de proteïnes del teixit vegetal. Balasubramaniam i col. (2003) han demostrat que el pH té un efecte especialment important en l'extracció de proteïna total de tabac. Canviant el pH de 3 a 9 la quantitat de proteïnes natives extretes variava de 1 a 1,6% (p/p) de la biomassa. Una vegada s'ha extret la proteïna recombinant, el següent pas consisteix en separar les fases soluble i insoluble, normalment per centrifugació o filtració. Un altra opció consisteix en utilitzar en aquesta etapa resines EBA (*expanded bed absorption*) que permeten acoblar la separació soluble/insoluble amb la concentració i la separació cromatogràfica (Menkhous i col., 2004). Tot i així, la gran mida de les partícules sòlides presents en els extractes vegetals representa un problema per emprar aquesta tècnica, ja que poden col·lapsar l'entrada de la columna i són difícils d'eluir (Bai i Glatz, 2003).



**Figura 5. Procés general per a la recuperació d'una proteïna recombinant a partir de material vegetal.**

En la majoria de casos, els protocols utilitzats en l'etapa de purificació de proteïnes recombinants en plantes es basen en tècniques cromatogràfiques, ja sigui utilitzant columnes de bescanvi iònic, hidrofòbic o d'exclusió molecular, o la combinació d'aquestes (Kusnadi i col., 1998). Tanmateix, en el cas de la producció d'anticossos es prefereix la purificació per afinitat amb proteïna A (Chargelegue i col. 2000) o l'antigen (Fischer i col., 1999), ja que proporciona un millor rendiment. L'addició d'un *tag* a la proteïna recombinant és una altra opció per millorar l'eficiència

de purificació (Mejare i col., 1998), encara que si estem expressant un fàrmac, a l'afegir la seqüència del *tag* estem compromentent la seva funcionalitat. A part de la cromatografia també existeixen altres mètodes que s'han emprat en la purificació de proteïnes a partir de plantes. La precipitació selectiva amb sals o polielectròlits és un sistema senzill i barat que s'utilitza normalment per eliminar compostos contaminants abans d'una separació cromatogràfica (Menkhaus i col., 2004). Un altre mètode no cromatogràfic és l'extracció aquosa en dos fases, que permet fraccionar l'extracte i separar els sòlids en una única operació (Balasubramaniam i col., 2003).

Per tal de simplificar la purificació i reduir la necessitat de cromatografia, actualment s'han desenvolupat diverses estratègies basades en l'expressió de proteïnes de fusió. Un exemple és la tecnologia desenvolupada per l'empresa SemBioSys Genetics (<http://www.sembiosys.com>), en què la proteïna d'interès és expressada en cereals com a fusió amb la oleosina. D'aquesta manera, la proteïna de fusió es pot recuperar fàcilment de cossos oleics i, mitjançant una endoproteasa, alliberar la proteïna recombinant (Seon i col, 2002). Recentment, ERA-Biotech (<http://www.erabiotech.com>) ha desenvolupat una altra tecnologia basada en la acumulació de la proteïna d'interès en cossos proteics mitjançant fusió amb dominis Zera<sup>®</sup> rics en prolina. Aquesta estratègia permet purificar la proteïna de fusió en un sol pas mitjançant l'aïllament dels cossos proteics per centrifugació. Tot i que aquestes estratègies permeten purificar la proteïna de fusió amb un simple pas de fraccionament subcel·lular, tenen l'inconvenient que és necessari processar la fusió per obtenir la proteïna d'interès.

## **2. T-20, inhibidor de la fusió del VIH-1**

### **2.1. El Virus de l'Immunodeficiència Humana (VIH-1)**

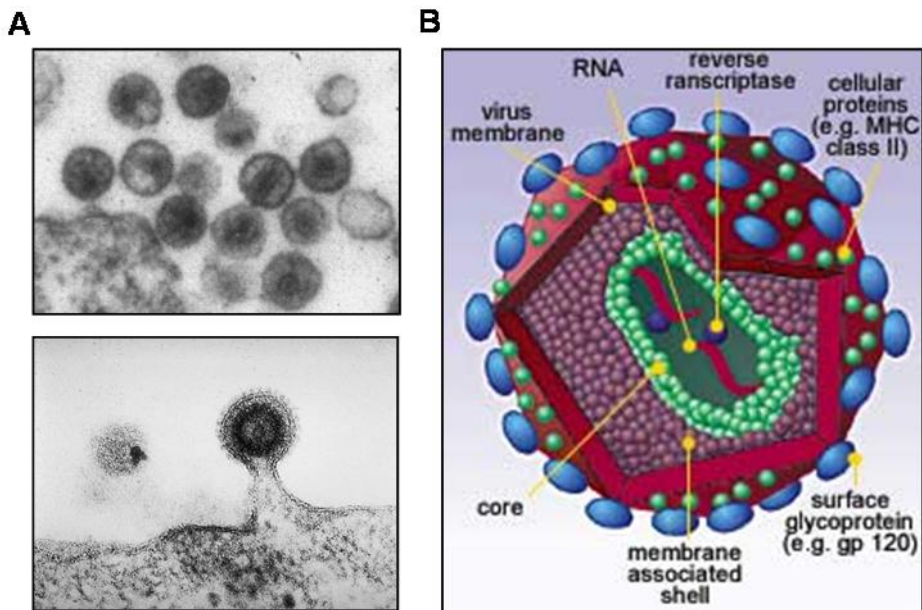
Encara que la síndrome de l'immunodeficiència adquirida (SIDA) induïda per VIH-1 va ser descrita fa només dues dècades, s'ha convertit en una pandèmia d'enormes proporcions. Al maig de 2006, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va estimar que més de 38,6 milions de persones estaven infectades per VIH i que uns 30 milions de persones ja havien perdut la vida per culpa d'aquesta malaltia. El gran esforç per desenvolupar teràpies antivirals ha fet disminuir la mortalitat en els països desenvolupats, però tot i així s'estima que actualment més de 40.000 persones s'infecten cada any als Estats Units. A més, l'epidèmia es continua estenent a l'Àfrica sub-sahariana i el sud-est asiàtic i està guanyant cada vegada més força a Rússia, Europa de l'est i l'Amèrica llatina (LaBranche i col., 2001). Aquest panorama està provocant una gran inversió econòmica en investigació per al desenvolupament d'una vacuna contra la infecció del VIH i teràpies antivirals que permetin prolongar i millorar la qualitat de vida dels infectats pel virus.

#### **2.1.1. Estructura del VIH-1**

El virus de la immunodeficiència humana (VIH-1), pertany a la família *Retroviridae*, que comprèn un gran nombre d'espècies víriques que infecten fonamentalment vertebrats. Aquesta família està dividida en tres subfamílies: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* i *Spumavirinae*. El VIH pertany a la subfamília dels Lentivirus, anomenada així perquè un dels trets característics és produir infeccions lentes i latents. En aquesta família també trobem els virus de l'immunodeficiència dels simis (VIS) i dels felins (VIF), així com un altre virus que infecta humans i està localitzat a l'Àfrica oriental (VIH-2) (Hirsch i col. 1989).

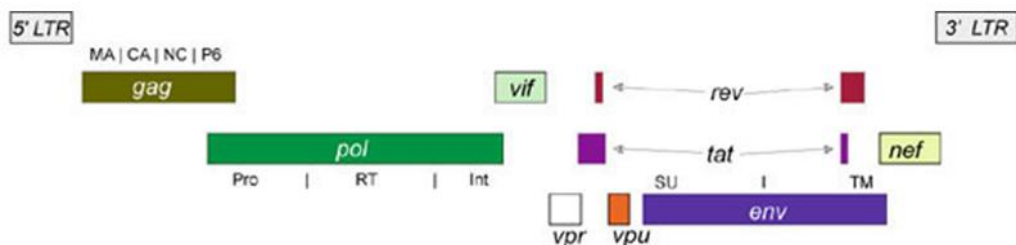
El VIH-1, com tots els lentivirus, presenta una estructura amb forma esfèrica d'uns 100 nm de diàmetre i consta d'una bicapa lipídica externa que recobreix un core nucleoproteic que conté el genoma viral (Fig.6)(Turner i col., 1999). L'embolcall viral prové de la membrana de la cèl·lula infectada i en ella trobem dos proteïnes involucrades en el procés d'entrada del virus: la glicoproteïna de la superfície viral gp120, i la glicoproteïna transmembrana gp41. El core està format per la proteïna estructural p24 que protegeix el material genètic del virus: dos cadenes de RNA amb dos proteïnes associades, p9 i p6. Dins la nucleocàpside també trobem dos enzims importants en el cicle vital del virus, la retrotranscriptasa i la integrasa viral. Entre l'embolcall i la nucleocàpside hi ha una matriu que dona integritat al virus i que està constituïda majoritàriament per la proteïna p17.





**Figura 6. Estructura del VIH-1.** Micrografies electròniques (A) de VIH-1 en el procés d'alliberació (Turner, 1999) i representació esquemàtica d'un virió madur (B).

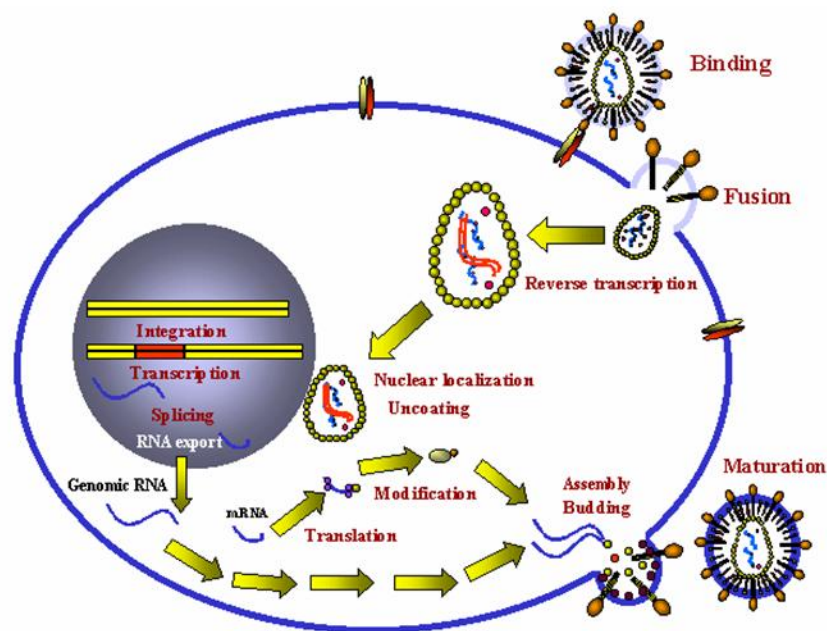
La mida del genoma viral és de 9,8 Kb i està flanquejat en els dos extrems per seqüències LTR (Fig.7). En la zona central es troben els gens que codifiquen per 9 proteïnes estructurals que provenen del processament de 3 grans precursors: Gag que formarà la nucleocàpside del virus, Pol que donarà lloc als tres enzims (proteasa, retrotranscriptasa i integrasa) i Env que formarà el complex glicoproteic de la membrana. A més, el genoma viral també inclou sis proteïnes més que tenen funcions reguladores (Frankel, 1998).



**Figura 7. Estructura del genoma del VIH-1.**

### 2.1.2. Cicle vital del VIH-1

El cicle de replicació del VIH-1 es pot dividir en una fase primerenca i una fase tardana. La primera comença amb la unió del virus a la superfície de la cèl·lula diana i finalitza amb la integració del DNA proviral al genoma de la cèl·lula. En aquest estadi el virus es pot mantenir en latència esperant un estímul extern que activi la seva transcripció. La fase tardana del cicle comença amb la transcripció i processament del RNA viral i acaba amb l'alliberament dels virions de la cèl·lula infectada.



**Figura 8. Esquema representatiu del cicle vital del VIH-1.**

Aquestes dues fases del cicle de replicació es poden dividir en diverses etapes: entrada del virus, transcripció reversa del RNA viral, integració al genoma de la cèl·lula, expressió i maduració de proteïnes virals i, finalment, alliberament del virions (Fig.8). El primer pas consisteix en la interacció del complex glicoproteic del virus amb receptors específics de la superfície cel·lular. Aquesta unió induirà canvis conformacionals en les glicoproteïnes virals que conduiran a la fusió de les membranes del virus i la cèl·lula receptora. Així, la nucleocàpsid viral és alliberada en el citoplasma de la cèl·lula infectada. A continuació es produeix la transcripció reversa del RNA viral a DNA lineal. L'absència d'activitat 3'-5' exonucleasa de la retrotranscriptasa provoca una alta taxa d'error en la replicació, fet que genera la gran variabilitat genòmica característica del VIH-1 (Mansky, 1995). La doble cadena de DNA proviral és transportada al nucli de la cèl·lula infectada i és integrada en el genoma mitjançant l'acció de l'integrasa. L'expressió dels gens virals és un procés altament regulat en el que intervien tant components de la maquinària de transcripció de la cèl·lula com proteïnes reguladores del virus. Els transcrits virals tenen dos rols fonamentals: constituir el RNA genòmic dels virus descendents i donar lloc als

precursors proteïcs Gag, Pol i Env. A continuació es produeix l'assemblatge d'aquest precursors amb el RNA genòmic del virus i l'alliberament al medi extracel·lular de les partícules víriques. L'última etapa consisteix en la maduració del virions mitjançant la proteasa viral.

El coneixement dels mecanismes moleculars implicats en cada pas del cicle vital del virus ha estat essencial per al desenvolupament de fàrmacs antiretrovirals. Fins fa pocs anys les teràpies antivirals tenien com a dianes terapèutiques dos punts del cicle vital del VIH: la retrotranscriptasa i la proteasa viral. Els inhibidors de la retrotranscriptasa viral van ser els primers agents antivirals desenvolupats contra la infecció de VIH-1 i actualment formen part de la majoria de còctels terapèutics. Dins d'aquest grup es poden diferenciar els anàlegs de nucleòsids com AZT i 3TC i els no nucleòsids com Nevirapine i Delavirdine. D'altra banda, els inhibidors de la proteasa tenen com a missió impedir el processament del precursor Gag, evitant així la maduració dels virions. Aquest grup està format bàsicament per pèptids que mimetitzen el substrat de l'enzim (pex. Indinavir, Ritonavir, Saquinavir).

Encara que en molts pacients la combinació de teràpies antivirals comporta una forta reducció de la càrrega viral, l'elevada taxa de mutació del virus porta a l'aparició de virus resistents. A més, alguns pacients pateixen efectes secundaris greus que impossibiliten el tractament amb determinats fàrmacs. És per això que s'està fent un gran esforç en el desenvolupament de nous fàrmacs que tinguin com a diana altres etapes del cicle vital del virus. La inhibició de l'entrada del virus es l'opció més atractiva, ja que les molècules virals que hi participen estan exposades al medi extracel·lular i són més accessibles que dianes intracel·lulars com l'integrasa.

## **2.2. Entrada del VIH-1 dins la cèl·lula diana**

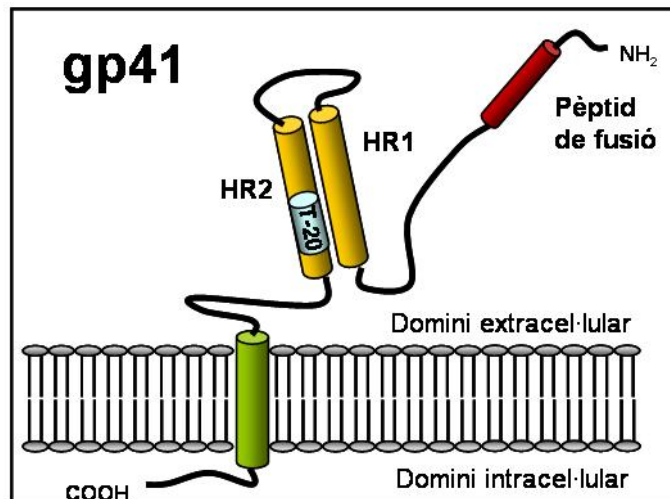
L'entrada del VIH-1 a la cèl·lula diana és un procés complex en el que intervien tant components de l'embolcall viral (gp120 i gp41) com receptors de la cèl·lula hoste. Només aquelles cèl·lules que expressin el receptor viral CD4 i el coreceptor de quimioquines CCR5 o CXCR4 són susceptibles de ser infectades. Conseqüentment, la infecció del VIH-1 està dirigida a limfòcits-T, macròfags i cèl·lules dendrítiques.

### **2.2.1. Proteïnes de l'embolcall del VIH-1**

Les proteïnes de l'embolcall del virus són sintetitzades com un únic precursor polipeptídic (gp160) a partir del DNA proviral. Posteriorment, gp160 és digerida donant lloc a dos proteïnes funcionals (gp120 i gp41) que són extensament glicosilades a l'aparell de Golgi i transportades a la membrana cel·lular. Com a conseqüència del procés d'escissió de les partícules víriques a partir de la membrana de la cèl·lula

infectada, aquestes glicoproteïnes acabaran constituint el complex proteic de l'embolcall cel·lular.

La glicoproteïna gp120 forma la subunitat de superfície de l'embolcall proteic i té com a principal missió la interacció amb el receptor CD4 i els receptors de quimioquines de la cèl·lula hoste (Kwong i col., 1998). La seva estructura és globular i conté cinc regions variables (V1-V5) localitzades a la superfície de la proteïna que permeten canvis en la conformació de gp120. Els extrems N- i C-terminals es troben en un domini intern que està associat amb gp41.



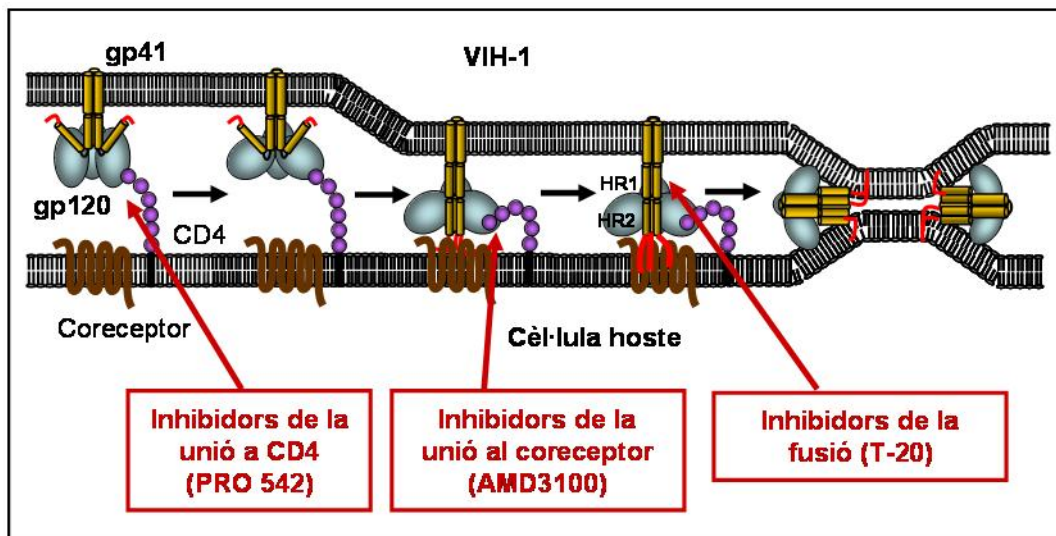
**Figura 9. Representació esquemàtica de la glicoproteïna gp41 del VIH-1.** En blau s'ha marcat la seqüència de HR 2 corresponent al T-20.

La glicoproteïna gp41 és una proteïna transmembrana que intervé en la fusió de les membranes del VIH-1 i la cèl·lula hoste (Chan i col., 1997). En ella es poden diferenciar un petit domini intracel·lular, un domini transmembrana i un domini extracel·lular (Fig. 9). El domini extracel·lular conté diferents motius virals involucrats en la fusió de les membranes. A l'extrem amino terminal es pot diferenciar un pèptid de fusió hidrofòbic que serà l'encarregat d'introduir-se en la membrana diana. En aquest domini també trobem dos seqüències hidrofòbiques repetides: HR1 i HR2. Aquestes seqüències presenten un motiu de cremallera de leucines que els hi confereix l'estructura de  $\alpha$ -helix. Durant el procés d'entrada gp41 pateix una sèrie de canvis de conformació en els quals les regions HR1 i HR2 tenen una important funció.

### 2.2.2. Procés d'entrada del virus

L'entrada del virus comença amb la interacció de la glicoproteïna de superfície gp120 amb el receptor viral CD4. Aquesta unió provoca un canvi de conformació en les regions variables (V1, V2 i V3) de gp120 que resulta en l'exposició d'una seqüència altament conservada que permet la interacció amb els coreceptors de quimioquines CXCR4 i CCR5. A continuació, i com a conseqüència de la unió dels coreceptors, es

produeixen una sèrie de canvis de conformació en gp41 que condueixen a la fusió de membranes. Gp41 es troba inicialment en un estat replegat en què les regions HR1 i HR2 de tres monòmers formen una espiral amagant el pèptid de fusió en l'interior del complex. La unió dels coreceptors indueix l'estirament de les seqüències HR ancorant el pèptid de fusió a la membrana de la cèl·lula. En aquest estadi gp41 exposa la regió HR2 i és vulnerable a la inhibició per pèptids. Degut a la baixa estabilitat termodinàmica d'aquest estadi, les regions HR2 es repleguen novament posant en contacte les membranes viral i cel·lular. Es produeix llavors la fusió de membranes i la internalització de la nucleocàpsid viral en l'interior de la cèl·lula.



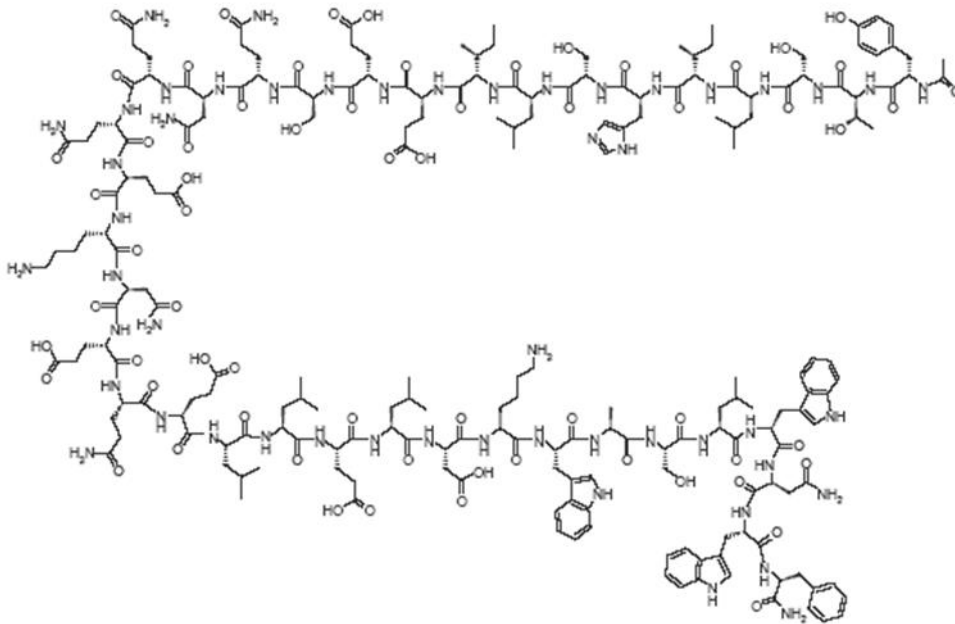
**Figura 10.** Esquema representatiu del procés d'entrada del VIH-1 a la cèl·lula diana. En vermell s'indiquen els tres possibles llocs d'intervenció en el procés d'entrada així com el fàrmac més representatiu dins de cada grup. Esquema adaptat a partir de Doms i col., 2000.

En aquest procés d'entrada existeixen tres punts que són susceptibles de ser inhibits: la unió del receptor CD4, la unió dels coreceptors i els canvis de conformació de gp41. Actualment s'estan desenvolupant agents terapèutics per inhibir cadascuna d'aquestes etapes (Fig.10).

### 2.3. T-20: estructura i mecanisme d'acció

El T-20 és un pèptid de 36 aminoàcids homòleg a la regió 127-162 del domini extracel·lular de la glicoproteïna gp41 del VIH-1. També es coneix com a DP-178, enfuvirtide o amb el nom comercial de Fuzeon. El T-20 constitueix el principal representant del grup d'inhibidors de la fusió anomenats C-pèptids, els quals es caracteritzen per presentar una seqüència que mimetitza part de la regió repetitiva C-terminal HR2 de gp41 (Fig.9). En la figura 11 es detalla la seva fórmula estructural. Cal

destacar que el pèptid sintètic comercial presenta modificacions en els seus extrems. L'extrem N-terminal es troba acetilat, mentre que l'extrem C-terminal està amidat.



Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub>

**Figura 11. Fórmula estructural i seqüència del T-20.** El pèptid sintètic que es comercialitza presenta un grup acetil en l'extrem N-terminal i un grup amida en l'extrem C-terminal.

El mecanisme d'acció del T-20 més àmpliament acceptat consisteix en la unió del pèptid a la regió HR1 de gp41 en el moment en què aquesta es troba en la seva forma desplegada (Cooley i col., 2003). En aquest estat intermediari de gp41 que pot durar diversos minuts (Jones i col., 1998) el T-20 exerceix un efecte dominant negatiu al competir amb la regió HR2 de la pròpia gp41 per unir-se a la regió HR1. D'aquesta manera el T-20 impedeix el canvi conformacional necessari per a la fusió de membranes bloquejant el procés d'entrada del virus. Estudis recents d'interacció *in vitro* realitzats per Liu i col. (2005) qüestionen aquest model, proposant que el T-20 no impediria el replegament de gp41 mitjançant la unió a la regió HR1 sinó que actuaria unint-se a altres seqüències de gp41 i gp120.

El T-20 inhibeix l'entrada del virus a una concentració efectiva 50 (CE50) de 2 ng/mL en línies cel·lulars humanes (Wild i col., 1993). En un sistema *in vivo*, la potent activitat antiviral del T-20 va ser demostrada per Kilby i col. (1998) mitjançant un assaig clínic realitzat amb 16 pacients. Es van administrar durant 2 setmanes diferents dosis de T-20 per via intravenosa, donant com a resultat un descens del RNA viral de 2 log<sub>10</sub> corresponent a una reducció del 99% en la càrrega viral. Aquesta reducció és comparable amb la produïda per les teràpies retrovirals que s'estan utilitzant

actualment. També es va poder observar una relació dosi-resposta amb un màxim d'eficàcia quan s'administraven 100 mg de pèptid dues vegades al dia. Aquests prometedors resultats van portar al T-20 a la designació de *fast track* per la *Food and Drug Administration* (FDA), fet que va accelerar els assaigs clínics de fase II i III. Finalment, el maig de 2003 la FDA va aprovar la utilització del T-20 en combinació amb altres retrovirals per al tractament d'infeccions avançades en adults i nens.

Actualment, el T-20 és produït per síntesi química per Trimeris - Hoffmann La Roche i és comercialitzat sota el nom de Fuzeon ([www.fuzeon.com](http://www.fuzeon.com)). La seva síntesi inclou més de 100 reaccions químiques, fet que comporta un elevat cost del producte final. Segons dades actuals el tractament amb fuzeon pot arribar fins a 20.000 € a l'any. Aquest fet comporta que només una petita part dels pacients potencials pugui ser tractat amb aquest fàrmac. Per aquests motius vam creure que la seva producció en un sistema heteròleg podria ser una bona alternativa. Així, en aquest treball ens hem plantejat el desenvolupament d'un sistema de producció de T-20 en plantes transformades amb l'objectiu de demostrar que pot representar una alternativa a la síntesi química. Per comprovar que el pèptid expressat en plantes és funcional s'han realitzat assaigs d'activitat en cèl·lules en cultiu comparant-lo amb un pèptid T-20 produït per síntesi química. D'aquesta manera es pretén determinar si la producció en planta pot representar una disminució en l'activitat del fàrmac.