(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 364 182**

(21) Número de solicitud: 201030204

(51) Int. Cl.:

C12N 15/46 (2006.01)
C07K 14/14 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **12.02.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2011**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **26.08.2011**

(71) Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS
Oficina de Investigación e Tecnoloxía
Campus Universitario Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

(72) Inventor/es: **Brandariz Núñez, Alberto;**
Menaya Vargas, Rebeca;
Benavente Martínez, Francisco Javier y
Martínez Costas, José Manuel

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

(54) Título: **Aplicaciones de la proteína muNS y sus derivados.**

(57) Resumen:
Aplicaciones de la proteína muNS y sus derivados.
Los autores de la invención han identificado la región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus aviares capaz de formar inclusiones. Asimismo, debido a la capacidad de algunas regiones de la proteína muNS de incorporarse a las inclusiones, también han descrito un método de purificación y un método para la detección de la interacción entre dos polipéptidos.

ES 2 364 182 A1

DESCRIPCIÓN

Aplicaciones de la proteína muNS y sus derivados.

Campo de la invención

La invención se relaciona con la identificación de la región mínima de la proteína muNS de los Orthoreovirus aviares capaz de formar inclusiones. Asimismo, la invención se relaciona con un método de purificación y un método para la detección de la interacción entre dos polipéptidos, basado en la capacidad de algunas regiones de la proteína muNS de incorporarse a las inclusiones, junto con un péptido de interés.

Antecedentes de la invención

Los reovirus aviares son miembros del género Orthoreovirus, uno de los 12 géneros de la familia Reoviridae (Attoui *et al*., 2000, J. Gen. Virol. 81:1507-15). Estos virus son importantes patógenos de aves y causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola (Jones, 2000. Rev. Sci. Tech. 19: 614-25). Los reovirus aviares son virus sin envoltura lipídica que se replican en el citoplasma de las células infectadas y poseen un genoma de 10 segmentos de ARN de doble cadena rodeados por una doble cubierta proteica concéntrica de 85 nm de diámetro (Zhang *et al*., 2005. Virology, 343: 25-35). Los segmentos genómicos están divididos en tres clases en función de su movilidad electroforética, tres de la clase L (large o grande), otros tres de la M (medium o mediana) y cuatro de la S (small o pequeña) (Varela y Benavente, 1994. J. Virol. 68: 6775-7). Con excepción del segmento S1, que es tricistrónico, todos los demás genes son monocistrónicos (Bodelon *et al*., 2001. Virology, 290: 181-91). Los segmentos genómicos se transcriben por medio de una polimerasa dependiente de ARN para producir ARN mensajeros (ARNm) con una secuencia nucleotídica idéntica a la de la cadena positiva del segmento de ARN de doble cadena (Li *et al*., 1980. Virology, 105: 41-51). Los ARNm virales ejercen una doble función en las células infectadas: programan la síntesis de proteínas virales en los ribosomas, y sirven como molde para la síntesis de las cadenas negativas de los segmentos genómicos.

El genoma del reovirus aviar codifica al menos 12 proteínas, de las cuales 8 son estructurales (que se incorporan al virión), y 4 no estructurales, que se expresan en células infectadas, pero no forman parte de los reoviriones maduros (Martínez-Costas *et al*., 1997. J. Virol. 71: 59-64). Las proteínas codificadas por los genes de la clase L se denominan lambda (λ), las codificadas por los de la clase M, mu (μ) y los codificados por los de la clase S, sigma (σ). A las proteínas estructurales de cada clase se les ha asignado un sufijo alfabético (λA, λB, etc.) según su movilidad electroforética. El reovirión contiene al menos 10 proteínas estructurales diferentes, 8 de las cuales (λA, λB, λC, μA, μB, σA, σB y σC) son productos primarios de traducción de sus mRNAs, mientras que las otras dos, μBN y μBC, se originan por procesamiento proteolítico del precursor μB (Varela *et al*., 1996. J. Virol. 70: 2974-81). Además de las proteínas estructurales, los reovirus aviares expresan cuatro proteínas no estructurales. Así, los genes M3 y S4 expresan dos proteínas no estructurales mayoritarias, denominadas μNS y σNS, respectivamente (Varela y Benavente, 1994, citado ad *supra*) mientras que p10 y p17 están codificadas por los dos primeros cistrones del gen SI (Bodelon *et al*., 2001, citado *ad supra*).

Los reovirus aviares se replican en inclusiones globulares citoplasmáticas denominadas factorías virales o viroplasmas, las cuales contienen proteínas virales estructurales y no estructurales, sin embargo carecen de membranas y organelas celulares (Touris-Otero *et al*., 2004; J. Mol. Biol. 341: 361-74). La expresión individual de proteínas virales en células transfectadas reveló que la proteína no estructural muNS es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al*., 2004; citado *ad supra*). Esto, y el hecho de que las inclusiones globulares citoplasmáticas formadas por muNS en células transfectadas son muy similares en apariencia a las factorías virales de células infectadas, sugieren que muNS es el factor viral mínimo requerido para la formación de factorías virales en células infectadas con el reovirus aviar. El análisis de células transfectadas que co-expresan muNS y otras proteínas virales reveló que muNS juega un papel importante en estadios tempranos de la morfogénesis del virus y que el reclutamiento de proteínas del reovirus aviar a las factorías virales es un proceso selectivo y controlado temporalmente (Touris-Otero *et al*., 2004; citado *ad supra*).

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

A pesar de que las proteínas muNS de reovirus aviar y de mamífero muestran únicamente un 28,3% de identidad de secuencia, ambas contienen dos regiones en su extremo C-terminal con una alta probabilidad de estructura "coiled-coil". Por otro lado, la proteína de mamífero es 86 aminoácidos más larga y es capaz de hacer más contactos primarios con otras proteínas virales estructurales y no estructurales que la proteína aviar (Broering *et al*. 2004; J. Virol. 78: 1882-92). Aunque las proteínas muNS de todas las cepas de reovirus mamíferos (MRV) producen inclusiones globulares cuando se expresan en células transfectadas, la mayoría de las cepas producen factorías virales con morfología filamentosa durante la infección (Parker *et al*. 2002; J. Virol. 76:4483-96; Broering *et al*., 2002 J. Virol. 76: 8285-8297). El fenotipo filamentoso de las factorías de reovirus de mamífero se ha atribuido a la proteína mu2, debido a su capacidad de asociarse tanto con microtúbulos y con muNS de reovirus mamífero. La expresión de versiones

truncadas de muNS de MRV en células transfectadas reveló que el segmento entre los residuos 471-721 es la región más pequeña de muNS necesaria y suficiente para formar inclusiones (Broering *et al*. 2005; J. Virol. 79: 6194-6206). Se predice que esta región contiene dos segmentos de secuencias con alta probabilidad de formar estructuras "coiled-coil", que están unidas por una región, precedida por un tramo de aproximadamente 50 residuos y seguido por una cola C-terminal. A pesar de que se ha descrito la región mínima de muNS en MRV capaz de formar inclusiones, en los reovirus aviares no se ha identificado dicha región. En la presente memoria, además de determinar dicha región, se describe qué dominios de muNS son capaces de incorporarse a las inclusiones citoplasmáticas formadas por la proteína entera, para comprobar cuáles de ellos están directamente implicados en la interacción entre monómeros de muNS y así desarrollar un método para la purificación de proteínas, así como un método para detectar la interacción entre polipéptidos.

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

Recientemente se ha descrito un nuevo sistema que utiliza la formación de inclusiones por la proteína muNS de los reovirus de mamífero como una plataforma para detectar interacciones entre proteínas *in vivo* en células de mamífero (Miller *et al*., 2007. Mol Cell Proteomics. 6, 1027-38) y que ha sido adaptado también para usarse en levaduras (Schmitz *et al*., 2009. Nat Methods; 6, 500-2). En este sistema, la proteína problema se fusiona con la zona C-terminal de muNS para que la fusión genere inclusiones citoplasmáticas y atraiga a ellas al ligando de la proteína problema. En el sistema de levaduras, estos autores demuestran que su sistema es superior al del doble híbrido en el número y tipo de interacciones detectadas, al menos con las proteínas ensayadas en dicho trabajo. Sin embargo, este sistema presenta varios problemas, entre los que se destacan: i) ciertas proteínas pueden plegarse incorrectamente al fusionarlas con la muNS-Mi y perder capacidad de interacción con sus ligandos; ii) algunas proteínas pueden interferir con la capacidad de formación de inclusiones de muNS-Mi y bien, no formarlas o generar agregados intracelulares, viéndose enormemente alterada la detección de interacciones; iii) la localización intracelular de la proteína problema o del ligando puede no ser la adecuada para poder ser detectada en inclusiones citoplasmáticas.

Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de desarrollar un sistema que presente ventajas con respecto a los sistemas existentes, en el que por ejemplo, la proteína fusionada a las inclusiones no altere la formación de dichas inclusiones, que la proteína fusionada mantenga su actividad y que se puedan incluir múltiples epítopos en dichas inclusiones.

Compendio de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido, en adelante polipéptido de la invención, que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS de un orthoreovirus aviar o una variante funcionalmente equivalente de dicha región y que presenta la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en donde dicho polipéptido no es la proteína completa de muNS aviar.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención y con una célula que comprende dicho polinucleótido o el polipéptido de la invención.

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

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores,

en donde el segundo componente no contiene un polipéptido que comprende los aminoácidos de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero correspondientes a la secuencia 605-635 (SEQ ID NO: 6) de dicha proteína aviar.

En otro aspecto la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención, así como con una célula que incluye la proteína de fusión de la invención o el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el polipéptido de la invención o la proteína de fusión de la invención, que comprenden además al menos un componente seleccionado del grupo: péptido para facilitar su purificación y péptido de señalización nuclear.

En otro aspecto la invención se relaciona con un kit que comprende:

(i) un primer componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica la proteína muNS de un Orthoreovirus o una variante funcionalmente equivalente;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(c) una célula que expresa la proteína muNS de un Orthoreovirus o un polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de dicha proteína o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión para su uso en medicina, que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

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

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

para incorporar el primer componente a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polipéptido que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de purificación de las inclusiones formadas por un polipéptido seleccionado del grupo: polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero, la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero y una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que comprende:

(a) expresar en una célula dicho polipéptido y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones; y

(b) purificar dichas las inclusiones.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de purificación de un polipéptido que comprende una proteína de interés que comprende:

(a) expresar en una célula el polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero, o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en condiciones adecuadas para que se produzca interacción entre las inclusiones generadas en la etapa (a) y el segundo componente de la proteína de fusión;

y en donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en cualquier orden,

(c) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión; y

(d) separar la proteína de fusión de las inclusiones.

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

(a) expresar en una célula el polipéptido seleccionado del grupo: polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero, la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar, de mamífero y una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula la proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene el primer polipéptido; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones expresadas en la etapa (a);

(c) expresar en dicha célula el segundo polipéptido o bien mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido;

en donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo en cualquier orden y

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

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un resumen de las truncaciones en el extremo C-terminal de muNS. La proteína completa muNS está indicada esquemáticamente por una línea horizontal negra que abarca los residuos 1-635 (posiciones numeradas arriba). En la parte inferior una línea similar indica cada truncación, que abarcan aproximadamente la porción de muNS que representan. La posición de los dos dominios coiled-coil están representados como barras grises dispuestas verticalmente. La capacidad de las construcciones para formar inclusiones intracelulares se indica como positivo (+) o negativo (-), y en la parte derecha de la Figura se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas.

La Figura 2 muestra un resumen de las truncaciones en el extremo N-terminal de muNS. (A) Las deleciones en N-terminal de muNS se indican de la misma manera que en la Figura 1. La capacidad de las construcciones para formar inclusiones intracelulares se indica como positivo (+) o negativo (-), o agregado (ag). (B) Análisis de inmunofluorescencia de las deleciones N-terminales. Las células CEF se fijaron 18 h tras la transfección con plásmidos que expresaban la proteína muNS completa (1), muNS (112-635) (2) o muNS (381-635) (3), como ejemplos de inclusiones grandes, agregadas y pequeñas, respectivamente. Las células se detectaron con anticuerpos de conejo anti-muNS (muNS) y de ratón contra ubiquitina conjugada (Ubq). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa 488 y anti-ratón conjugado con Alexa 594, respectivamente. En la imagen combinada, la colocalización de muNS (112-635) (2) y la ubiquitina conjugada se indica por un color más claro. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 3 muestra la composición de los dominios de muNS-Mi y la relevancia del dominio Intercoil. (A) Esquema de la fracción mínima de la proteína muNS con capacidad de formar inclusiones (muNS-Mi). Los cuatro dominios que la constituyen se indican con las posiciones de aminoácidos que marcan las posiciones inter-dominio: Coil1 o C1 (448-477); Intercoil o IC (477-542); Coil2 o C2 (539-605) y C-tail o CT (605-635). (B) Análisis de inmunofluorescencia de las deleciones en N-terminal. Las células CEF se fijaron tras 18 h de la transfección con plásmidos que expresan muNS completa (1-635) o muNS con mutaciones puntuales en el dominio Intercoil, tal como se indica en la Figura.

La Figura 4 describe diferentes deleciones de la proteína muNS y su incorporación a cuerpos de inclusión formados por la proteína entera. La proteína muNS está representada esquemáticamente por una línea horizontal negra que abarca los residuos 1-635 (posiciones numeradas arriba). Los mutantes de muNS, con el HA fusionado en su extremo C-terminal, se muestran como líneas negras que abarcan aproximadamente la porción de muNS que representan. El epítopo HA se representa como un cuadrado. Los dominios coiled-coil están representados como barras grises dispuestas verticalmente. En la parte inferior del esquema se muestra un diagrama que representa la fracción mínima de muNS que conserva la capacidad de formar inclusiones (muNS-Mi). Los cuatro dominios constituyentes de muNS-Mi están representados como rectángulos (Coil 1 o C1; el Intercoil o IC; el Coil 2 o C2 y la C-tail o CT). En la parte derecha de la Figura se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda (-muNS) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo-muNS (+muNS). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo policlonal contra el epítopo HA del virus influenza seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 5 muestra las fusiones de GFP a diferentes dominios de la proteína muNS y su incorporación a inclusiones formadas por la proteína muNS entera. La proteína muNS, así como sus quimeras, están representadas siguiendo las mismas reglas que en la Figura 1. La proteína GFP está representada como un barril. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (-muNS) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo-muNS (+muNS). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 6 describe deleciones de la proteína muNS y su incorporación a inclusiones formadas por la proteína muNS-Mi. La proteína muNS-Mi así como las regiones de muNS están representadas siguiendo las mismas reglas que en la Figura 1. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (-muNS-Mi) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo-muNS-Mi (+muNS-Mi). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra el epítopo HA del virus influenza, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 7 muestra las fusiones de GFP a diferentes dominios de la proteína muNS y su incorporación a inclusiones formadas por la proteína muNS-Mi. La proteína muNS-Mi, así como sus quimeras, están representadas siguiendo las mismas reglas que en la Figura 1. La proteína GFP está representada como un barril. A la derecha se muestran imágenes de microscopia de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (-muNS-Mi) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo-muNS-Mi (+muNS-Mi). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 8 muestra el análisis de la expresión de los baculovirus de muNS, muNS-Mi, GFP y GFP-Intercoil en células de insecto Sf9. (A) Gel de poliacrilamida al 12,5% teñido con azul de Coomassie donde se resolvieron muestras correspondientes a células Sf9 sin infectar (carril 1) o infectadas con los siguientes baculovirus recombinantes: Bac-Wt (carril 2) Bac-muNS (carril 3), Bac-muNS-Mi (carril 4), Bac-GFP (carril 5) y Bac-GFP-Intercoil (GFP *, carril 6). Las muestras se Usaron en tampón laemmli a las 72 h.p.i. antes de someterlas a electroforesis. (B) Análisis mediante Western-blot de lisados de células Sf9 sin infectar (carril 1), e infectadas con Bac-Wt (carril 2), Bac-muNS (carril 3) o Bac-muNS-Mi (carril 4) usando anticuerpos policlonales contra muNS. (C) Análisis mediante Western-blot de Usados de células Sf9 sin infectar (carril 1), infectadas con Bac-Wt (carril 2), Bac-GFP (carril 3) o Bac-GFP* (carril 4) usando un anticuerpo monoclonal contra GFP. (D) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Sf9 que habían sido infectadas con los siguientes baculovirus: Bac-muNS, Bac-muNS-Mi, Bac-GFP y Bac-GFP-Intercoil (GFP*). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (paneles superiores) o se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia, en el caso de las que expresaban GFP (paneles inferiores). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 9 describe la expresión y purificación de GFP-Intercoil gracias a su integración en inclusiones formadas por muNS. (A) Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de inclusiones de muNS co-expresadas con GFP. Las células Sf9 co-infectadas con Bac-muNS y Bac-GFP se Usaron en tampón hipotónico a las 72 h.p.i., y el extracto celular resultante (carril 1) se fraccionó por centrifugación en pellet y sobrenadante (carril 2). El pellet se lavó dos veces en tampón hipotónico, se resuspendió en el mismo volumen de tampón hipotónico y se sonicó. El extracto sonicado (carril 3) se centrifugó, y se fraccionó en pellet y sobrenadante (carril 4). El pellet se lavó y se centrifugó cinco veces (carril 5). Todas las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12,5% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra muNS (panel central) o un anticuerpo monoclonal contra GFP (panel inferior). La posición de muNS y GFP se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores moleculares a la izquierda. (B) Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de GFP-Intercoil co-expresada con muNS. Los primeros pasos de la purificación se realizaron como se indica arriba. El pellet lavado y resuspendido en sal (carril 5) se centrifugó y el sobrenadante (carril 6) se pasó a través de una columna de desalado. El eluido se centrifugó y el sobrenadante (carril 7) se incubó con el factor Xa (carril 8). Todas las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida del 12,5% teñido con azul de Coomassie (panel superior). Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra muNS (panel central) o un anticuerpo monoclonal contra GFP (panel inferior). La posición de muNS y GFP se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores moleculares a la izquierda. (C) Purificación de GFP: El extracto incubado con factor Xa (9B, carril 8) se centrifugó y el sobrenadante se cargó en una columna de Q-sepharosa. La proteína eluida se concentró y analizó mediante SDS-PAGE (carril 9) y Western-blot usando anticuerpo monoclonal contra GFP (carril 10). (D) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Sf9 co-infectadas con BacmuNS/Bac-GFP o con Bac-muNS/Bac-GFP-Intercoil (Bac-GFP*). Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 10 describe la expresión y purificación de GFP-Intercoil gracias a su integración en inclusiones formadas por muNS-Mi. La distribución de la Figura y de sus muestras es exactamente igual a la descrita para la Figura 9. La única diferencia radica en el uso de muNS-Mi (Figura 7) en lugar de muNS (Figura 5).

La Figura 11 describe la estrategia utilizada para utilizar las inclusiones de muNS como una plataforma para detectar asociaciones de proteínas en el interior de células eucariotas. La proteína muNS está representada esquemáticamente por una línea horizontal negra, seguida de los cuatro dominios presentes en la región C-terminal (muNS-Mi) que están representados como rectángulos (el Coil 1 o C1; el Intercoil o IC; el Coil 2 o C2 y la C-tail o CT). La proteína muNS forma inclusiones (Inc.) en el citoplasma celular e incorporaría a ellas a p53 etiquetada con la región Intercoil (IC). La p53-Intercoil secuestrada en las inclusiones serviría como cebo para reclutar a su ligando, el Antígeno T del SV40 (Ag.T).

La Figura 12 describe la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS o GFP-muNS en células CEF. (A) Localización subcelular de p53-Intercoil. Las células CEF semiconfluentes se transfectaron con el plásmido que expresa la quimera p53-Intercoil. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por muNS. (C) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFPmuNS. En (A), (B) y (C) las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 13 describe la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS o GFP-muNS en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por muNS. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP-muNS. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. En (A) y (B), las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente

se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 14 describe la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de muNS o GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53-Intercoil y antígeno T en células Cos-7. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan muNS y p53 o muNS y p53-Intercoil. (C) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP-muNS y p53 o GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A), (B) y (C), las células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592 y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. La GFP-muNS se visualizó directamente y los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 15 describe la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de muNS o GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células CEF. (A) Localización subcelular de p53-Intercoil en células CEF. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan muNS y p53 o muNS y p53-Intercoil. (C) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP-muNS y p53 o GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A), (B) y (C), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con el plásmido que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, si procede. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 16 describe la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS-Mi o GFP-muNS-Mi en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por muNS-Mi. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP-muNS-Mi. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando procede. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 17 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de muNS-Mi o GFP-muNS-Mi co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos7. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan muNS-Mi y p53 o muNS-Mi y p53-Intercoil. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP-muNS-Mi y p53 o GFP-muNS-Mi y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 18 muestra la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS-Mi o GFP-muNS-Mi. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por muNS-Mi. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP-muNS-Mi. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 19 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de muNS-Mi o GFP-muNS-Mi co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células CEF. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan muNS-Mi y p53 o muNS-Mi y p53-Intercoil. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP-muNS-Mi y p53 o GFP-muNS-Mi y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra

el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, cuando proceda. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 20 describe la localización subcelular de las inclusiones formadas por diferentes quimeras de muNS y muNS-Mi. (A) Distribución intracelular de VP16-muNS y NLS-Ag.T-muNS. (B) Distribución intracelular de VP16-GFP-muNS, NLS-Ag.T-GFP-muNS y NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 o en el caso de (B) directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La Figura 21 muestra la distribución intracelular de GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por VP16-muNS. (A) Localización subcelular de VP16-muNS. (B) Localización subcelular de GFP y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por VP16-muNS. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con el plásmido que expresa la proteína indicada a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 o en el caso de (B) detección directa de la fluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 22 muestra la distribución intracelular de GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por NLS-Ag.T-muNS. (A) Localización subcelular de NLS-Ag.T-muNS. (B) Localización subcelular de GFP y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por NLS-Ag.T-muNS. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con el plásmido que expresa la proteína indicada a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 o en el caso de (B) visualizado directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia siguiendo, las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 23 muestra la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por VP-16-muNS o VP16-GFP-muNS en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-muNS. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-GFP-muNS. En (A) y (B), las células Cos-7 se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte izquierda de la Figura, se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un secundario conjugado a Alexa 592 y anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488, en el caso de (A). La VP16-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 24 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de VP16-muNS o VP16-GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos-7. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-muNS y p53 o VP16-muNS y p53-Intercoil. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-GFP-muNS y p53 o VP16-GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en el caso de (A) anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La VP16-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 25 muestra la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por VP16-muNS o VP16-GFP-muNS en células CEF. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-muNS. (B) Localización subcelular de p53 o p53- Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-GFP-muNS. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en el caso de (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. La VP16-GFP-muNS se visualizó directamente y los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 26 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de VP16-muNS o VP16-GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células CEF. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-muNS y p53 o VP16-muNS y p53-Intercoil. (B) Localización subcelular del antígeno

T en células que co-expresan VP16-GFP-muNS y p53 o VP16-GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. La VP16-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 27 muestra la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por NLS-Ag.T-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-muNS. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-GFP-muNS. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. La NLS-Ag.T-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 28 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de NLS-Ag.T-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos-7. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-muNS y p53 o NLS-Ag.T-muNS y p53-Intercoil. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-GFP-muNS y p53 o NLS-Ag.T-GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La NLS-Ag.T-GFP-muNS se visualizó directamente. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 29 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi co-expresada con p53 o p53-Intercoil en células Cos-7. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi y p53 o NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células Cos-7 semiconfluentes se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 (en A) o el antígeno T (en B) seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592. La NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 30 muestra la distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares formadas por NLS-Ag.T-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS en células CEF. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-muNS. (B) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-GFP-muNS. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. La NLS-Ag.T-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 31 muestra la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de NLS-Ag.T-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células CEF. (A) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-muNS y p53 o NLS-Ag.T-muNS y p53-Intercoil. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-GFP-muNS y p53 o NLS-Ag.T-GFP-muNS y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, y en (A), anticuerpos policlonales contra muNS seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488. La NLS-Ag.T-GFP-muNS se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 32 describe la distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi co-expresada con p53 o p53-Intercoil en células CEF. (A) Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi. (B) Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi y p53 o NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi y p53-Intercoil. En (A) y (B), las células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la Figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 en (A) o antígeno T en (B) seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592. La NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi se visualizó directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la Figura 11.

La Figura 33 muestra la distribución intracelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS o muNS-Mi. (A) Localización subcelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 592, la GFP-Intercoil o GFP se visualizaron directamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (B) Localización subcelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por muNS-Mi. Células CEF se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas en la parte izquierda de la figura, se fijaron a las 24 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia como se indica arriba. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la figura 1.

La Figura 34 muestra la distribución intracelular de HaloTag y HaloTag-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por muNS o muNS-Mi. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se marcaron con TMR a las 24 h.p.t. y posteriormente se observaron con un microscopio de fluorescencia. La distribución del HaloTag y el Halotag-intercoil se observa en las figuras centrales. Los núcleos se tiñeron con DAPI. A la derecha de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia, siguiendo las normas del esquema de la figura 11.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que, sorprendentemente, una región de 187 aminoácidos de la proteína muNS del reovirus aviar (en adelante muNS-Mi) es suficiente para la formación efectiva de inclusiones. Asimismo, los inventores han desarrollado un método de purificación de polipéptidos basado en la capacidad de algunas regiones de dicha proteína de interaccionar con las inclusiones formadas por la proteína muNS completa de los Orthoreovirus, así como con las inclusiones formadas por la región muNS-Mi. De la misma manera, los autores han desarrollado un sistema de detección de interacciones entre dos polipéptidos.

El método para detectar interacciones de la invención es mucho más versátil que el descrito por Miller *et al.*, 2007. (*supra.*) para la proteína muNS del reovirus de mamífero y además solventa sus principales problemas, ya que i) las posibilidades de un mal plegamiento son menores al reducirse el tamaño de la etiqueta (66 residuos presenta el dominio Intercoil frente a 250 residuos la muNS-Mi que utilizan) y al no formar inclusiones *per se*; ii) no se depende de la posible interferencia de la proteína problema en la formación de inclusiones, ya que se dirige dicha proteína a las inclusiones formadas por muNS, muNS-Mi y sus derivados, que incluso pueden ser fluorescentes para facilitar el seguimiento; iii) se pueden integrar varias proteínas diferentes a la vez en la misma inclusión; y iv) se ha adaptado el método de la invención al compartimento nuclear donde se pueden detectar de una forma natural las interacciones entre proteínas nucleares.

Mínima región de la proteína muNS capaz de formar inclusiones

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la región de la proteína muNS de los reovirus aviares correspondiente a los residuos 448 a 635 es la región mínima que conserva la capacidad de la proteína completa de formar inclusiones, tal como se demuestra en el Ejemplo 1.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido, en adelante polipéptido de la invención, que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS de un orthoreovirus aviar o una variante funcionalmente equivalente de dicha región, en adelante muNS-Mi y que presenta la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en donde dicho polipéptido no es la proteína muNS del orthoreovirus aviar.

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

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

en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al*. Virology, 319; 94-106). Se trata de una proteína de 635 aminoácidos definida por el número de acceso AY608700 en la base de datos NCBI (SEQ ID NO: 56).

El término "orthoreovirus aviar" o "reovirus aviar", según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus *Reoviridae* y en concreto al grupo dentro del género que infecta aves. Presentan genomas dsRNA y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

El término "inclusión", según se usa en la presente invención, se refiere a agregados nucleares o citoplásmicos, normalmente de proteínas. En concreto, la proteína que forma las inclusiones en el género *Orthoreovirus* es la proteína muNS o μNS, que es una de las proteínas no estructurales codificada por el gen M3 y es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al*. *supra*.).

Por "variante funcionalmente equivalente" de la región formada por los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS aviar se entiende todos aquellos polipéptidos derivados de la secuencia de muNS mediante modificación, inserción y/o deleción de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las proteínas muNS mencionadas anteriormente. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de generar inclusiones en una célula.

Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%), al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de muNS arriba indicadas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al*. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc. Métodos adecuados para determinar la capacidad de muNS, de muNS-Mi o de la variante funcionalmente equivalente de muNS-Mi de generar inclusiones incluye, pero no se limita al método descrito en el Ejemplo 1 de la presente invención basado en la expresión de muNS o muNS-Mi y la detección por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos policlonales contra muNS, pudiéndose comprobar así la formación de dichas inclusiones.

Asimismo, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido, en adelante polinucleótido de la invención y una célula que comprende el polipéptido o el polinucleótido, en adelante la célula de la invención.

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

La célula de la invención puede ser cualquier célula procariota o cualquier célula eucariota. En la presente invención puede usarse prácticamente cualquier tipo celular, tal como se muestra en los Ejemplos 1, 6 y 8, en los que se utilizan células CEF, células Sf9 de insecto y células COS7. Cualquier célula huésped que pueda ser transformada con el polinucleótido de la invención, o que pueda ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante que contenga el polinucleótido de la invención, por ejemplo células animales (tal como células de mamífero, células de aves, células de insecto, etc.), células de plantas, levaduras, bacterias etc. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia [Sambrook *et al*., Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001].

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende adicionalmente un componente seleccionado del grupo: péptido para facilitar su purificación y péptido de señalización nuclear.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "péptido para facilitar su purificación" se refiere a un péptido útil para el aislamiento o purificación del polipéptido de la invención que está unido al extremo N ó C-terminal. Así, dicho péptido es capaz de la unión de uno o más ligandos de una matriz de afinidad, tal como una cromatografía de afinidad. Un ejemplo de dicho péptido es la cola de histidinas (His-tag) que puede contener seis residuos de histidinas (His6 o H6), que se puede unir a una columna de níquel o cobalto con alta afinidad. Otros ejemplos de dichos péptidos incluyen, aunque no se limitan, Arg-tag, FLAG-tag, Strep-tag, un epítopo capaz de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag (reconocido por un anticuerpo anti-c-myc), SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, Nus A, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "péptido de señalización nuclear" o NLS se refiere a una secuencia que dirige el polipéptido al que está unido al núcleo. Secuencias de localización celular adecuadas para el transporte del polipéptido de la invención al núcleo comprende tanto secuencias que actúan independientemente de activadores externos como secuencias son externamente activables en cuyo caso la célula que comprende el polipép-

tido se pone en contacto con un compuesto capaz de activar la secuencia de señalización nuclear. Secuencias NLS que no requieren de un activador para promover la translocación de las proteínas son ampliamente conocidas para el experto en la materia e incluyen todas aquellas secuencias capaces de ser reconocidas por el receptor heterodiméricos formado por importina alpha y beta, forman un complejo que es reconocido por el poro nuclear y se transloca a través de dicho poro a través de un proceso en el que ocurre hidrólisis de GTP. Un tipo de NLS son aquellas formadas por una región corta de aminoácidos básicos, tales como la NLS de antígeno T grande del virus SV40 formada por la secuencia PKKKRKV (SEQ ID NO: 57), que también ha demostrado ser efectiva en células de mamíferos. Otro tipo de NLSs son las que están formadas por una secuencia bipartita formada por dos regiones de amino ácidos básicos separados por un espaciador de 10 a 12 aminoácidos, tales como la NLS de la nucleoplasmina formada por la secuencia KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 58). Un tercer tipo de NLS son aquellas que se asemejan al homeodominio de la proteína MATα2 de *S. cerevisiae* o de la proteína c-myc, formada por las secuencias PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 59) y RQRRNELKRSF (SEQ ID NO: 60) en donde no se observa una acumulación particular de aminoácidos básicos. Otros ejemplos de NLS incluyen la secuencia NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 61) de la proteína M9 de hRNPA1, la secuencia RMRKFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKK DEQILKRRNV (SEQ ID NO: 62) del dominio IBB de la importina alpha, las secuencias VSRKRPRP (SEQ ID NO: 63) y PPKKARED (SEQ ID NO: 64) de la proteína T de mioma, la secuencia de la proteína p53 humana, la secuencia SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 65) de la proteína c-abl IV de ratón, las secuencias DRLRR (SEQ ID NO: 66) y PKQKKRK (SEQ ID NO: 67) de la proteína NS1 del virus de la gripe, la secuencia RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 68) del antígeno delta del virus de la hepatitis, la secuencia REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 69) de la proteína Mx1 de ratón, la secuencia KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK (SEQ ID NO: 70) de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, la secuencia RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 71) de los receptores de hormonas esteroideas humanos y la secuencia NLS de la proteína p17 del reovirus aviar (IAAKRGRQLD- SEQ ID NO: 72). Adicionalmente, la invención contempla el uso de NLS tales como los descritos en US2006121513 y WO05120588 así como de sustituyentes del tipo de los descritos en EP1695717 que permiten el transporte de proteínas que los contienen a través de la membrana nuclear.

En una realización particular, el polipéptido de la invención se encuentra fusionado a un polipéptido que comprende la proteína VP16 del herpesvirus y la NLS del Antígeno T de SV40.

En una forma preferida de realización, el polipéptido de la invención comprende un péptido de señalización nuclear y en concreto el NLS del antígeno T grande del virus SV40 formada por la secuencia PKKKRKV.

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

Los autores de la presente invención han identificado las regiones de la proteína muNS de origen aviar que determinan la capacidad de dicha proteína de incorporarse a las inclusiones de muNS que aparecen en células en las que se expresa dicha proteína. En concreto, los autores de la presente invención han observado que la región de muNS que mejor se incorpora a las inclusiones es la región intercoil (477-542), mientras que la región C-Tail (605-635) no parece participar en las interacciones monómero-monómero y los dos coiled-coil sí lo hacen (Coil 1 y Coil 2), pero con menor afinidad/especificidad que el Intercoil. Igualmente han identificado una región adicional (residuos 381-448) que también se incorpora con gran afinidad a las inclusiones de la proteína entera, pero no a las que forma muNS-Mi, tal como se muestra en el Ejemplo 3.

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

Así, en un segundo aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión, en adelante, proteína de fusión de la invención, que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en donde el segundo componente no contiene un polipéptido que comprende los aminoácidos de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero correspondientes a la secuencia 605-635 (SEQ ID NO: 6) de dicha proteína aviar.

El término "proteína de fusión", según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que comprenden dos o más regiones que proceden de proteínas distintas o heterólogas.

El término "proteína muNS o μNS del orthoreovirus aviar", según se usa en la presente invención, se refiere a una de las proteínas no estructurales codificada por el gen M3 del reovirus aviar u Orthoreovirus aviar y es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Touris-Otero *et al*. Virology, 319; 94-106). Se trata de una proteína de 635 aminoácidos definida por el número de acceso AY608700 en la base de datos NCBI (SEQ ID NO: 56).

El término "proteína muNS o μNS del orthoreovirus mamífero", según se usa en la presente invención, se refiere a una de las proteínas no estructurales codificada por el reovirus mamífero u Orthoreovirus mamífero y es la única proteína del reovirus de mamífero capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales (Becker, M. M. *et al*. 2003. J. Virol. 77:5948-5963). Se trata de una proteína de 721 aminoácidos definida por el número de acceso ABP48918 en la base de datos NCBI (SEQ ID NO: 55).

El término "orthoreovirus mamífero", según se usa en la presente invención, se refiere a uno de los doce géneros pertenecientes a la familia de virus *Reoviridae* y en concreto al grupo dentro del género que infecta mamíferos. Presentan genomas dsRNA y por ello, pertenecen al grupo III de virus.

El término "orthoreovirus aviar" ya se ha definido en la sección anterior, por lo que se hace referencia a ella.

Adicionalmente, los dos componentes de la proteína de fusión pueden estar conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación de los dos componentes. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en la proteína de fusión de la invención incluyen enteroquinasa (sitio de corte DDDDK- SEQ ID NO: 73), factor Xa (sitio de corte IEDGR- SEQ ID NO: 74), trombina (sitio de corte LVPRGS- SEQ ID NO: 75), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG- SEQ ID NO: 76), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP, SEQ ID NO: 77), inteínas y similares.

El primer componente de la proteína de fusión está constituido por un polipéptido de interés. Por "polipéptido de interés" se entiende cualquier polipéptido que se quiera incluir en forma de una proteína de fusión. En una realización particular, dicho polipéptido de interés puede ser un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o antígeno medioambiental o un antígeno tumoral.

Antígenos virales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen antígenos del VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humanos, (tales como gH, gL gM gB gC gK gE o gD o derivados de los mismos) o proteína temprana inmediata tales como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tales como gB o derivados de los mismos), virus de Epstein Barr (tales como gp350 o derivados de los mismos), virus de la varicela zóster (tales como gp1, II, III y IE63), o de un virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos de núcleo, El, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tales como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, de virus de la rubéola (tales como proteínas E1 y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humanos (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, eg L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células infectadas con virus influenza, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus), y similares (véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales).

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

bil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a la toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp*., incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp*., incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp*., incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp*., incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas del clostridium A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp*., incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp*., incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp*., incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonfi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp*., incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp*., incluyendo *C. trachomalis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp*., incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp*., incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana exterior poco comunes), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Toxoplasma spp*. y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rvl884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDal, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3 (documento EP 366 412) y posibles proteínas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico neumolisina, y derivados detoxificados mutantes de los mismos); antígenos derivados de *Haemophilus spp*., incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no clasificable (tales como OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y peptidos derivados de fimbrina, o variantes de múltiples copias o las proteínas de fusión de las mismas).

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

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

Alérgenos o antígenos medioambientales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y el pelo de animales, y alérgenos de la comida. Alérgenos del polen importantes de árboles, césped y hierbas se originan a partir de órdenes taxonómicos de *Fagales*, *Oleales*, *Pinales* y *Platanaceae* incluyendo entre otros abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), el orden de *Poales* incluyendo entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales* incluyendo entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico de los géneros *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacenamiento por ejemplo *Lepidoglyphys*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocepphalides*, los de mamíferos tales como gato, perro y caballo, pájaros, alérgenos de veneno incluyendo los que se originan de picaduras o mordeduras de insectos tales como los del orden taxonómico de *Hymenoptera* incluyendo abejas (superfamilia *Apidae*), avispas y

hormigas (superfamilia *Formicoidae*). Todavía otros antígenos alergénicos que pueden utilizarse incluyen alérgenos por inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

Antígenos tumorales adecuados como primer componente de la proteína de fusión de la invención incluyen, pero no se limitan a MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítopos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítopos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3-ζ, familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-fetoproteína, E-cadherina, α-catenina, 13-catenina, γ-catenina, p120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, lmp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, amll, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, a-catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p21ras), cáncer biliar (p21ras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p21ras), carcinoma de colon (p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (lmp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100Pmel117), miéloma (familia MUC, p21ras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (lmp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítopos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítopos del VLTH-1).

El segundo componente de la proteína de fusión se puede seleccionar del grupo:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

Sin embargo, el segundo componente no puede contener un polipéptido que comprende los aminoácidos de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero correspondientes a la secuencia 605-635 (SEQ ID NO: 6) de dicha proteína aviar.

Los polipéptidos que forman parte del segundo componente pueden corresponder a varios fragmentos de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar (381-448, 448-477 (Coil 1 ó C1), 477-542 (Intercoil) ó 539-605 (Coil 2 ó C2)) o a la secuencia correspondiente de la proteína muNS Orthoreovirus mamífero. Dichos fragmentos de la proteína muNS son capaces de dirigir al primer componente, es decir el polipéptido de interés, a las inclusiones, ya que interaccionan específicamente con otras proteínas muNS. Con el fin de determinar la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus de mamífero con respecto a dichos fragmentos de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, se puede llevar a cabo un alineamiento entre la secuencia de la proteína muNS aviar y la secuencia de la proteína muNS de mamífero. Dicho alineamiento de secuencias puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Se pueden llevar a cabo alineamientos óptimos de secuencias, por ejemplo con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2:482), con el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 1970, 48:443), por búsqueda de similitud con el método de Pearson y Lipman, (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85:2444), por implementación computerizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science

Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al*, eds. 1995 supplement).

Los polipéptidos que forman parte del segundo componente se pueden referir a variantes funcionalmente equivalentes de los fragmentos citados de la proteína muNS de un Orthoreovirus. Por "variante funcionalmente equivalente" se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia de muNS mediante modificación, inserción y/o deleción de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las proteínas muNS mencionadas anteriormente. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de incorporarse a las inclusiones formadas por la proteína completa o muNS-Mi en una célula. Métodos adecuados para determinar la capacidad de incorporarse en las inclusiones incluye, pero no se limita al método descrito en el Ejemplo 3 de la presente invención basado en la formación de las inclusiones y expresión de la proteína de interés en forma de proteína de fusión asociada a los fragmentos que la dirigen a las inclusiones. Posteriormente, se procedería a llevar a cabo inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos policlonales contra el epítopo HA o el epítopo de interés, pudiéndose comprobar la incorporación de dichos fragmentos a las inclusiones. Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%), al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de muNS arriba indicadas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al*. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

En una realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende adicionalmente un componente seleccionado del grupo de un péptido para facilitar su purificación y un péptido de señalización nuclear. Dicho componente se han definido anteriormente en la sección de "Mínima región de la proteína muNS capaz de formar inclusiones", por lo que se hace referencia a dicha explicación.

En una realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende un péptido de señalización nuclear, con el fin de dirigir la proteína de fusión al núcleo.

Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión y una célula que comprende el polipéptido o el polinucleótido.

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

Kit de la invención

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

(i) un primer componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica la proteína muNS de un Orthoreovirus o una variante funcionalmente equivalente;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(c) una célula que expresa la proteína muNS de un Orthoreovirus o un polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de dicha proteína o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 381- 448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 448- 477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

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

El kit de la invención comprende un primer componente que se selecciona entre un polinucléotido que codifica la proteína muNS completa o el fragmento de dicha proteína capaz de formar inclusiones. Asimismo, como primer componente, el kit puede comprender la célula que expresa la proteína completa o el fragmento de dicha proteína, capaces de formar inclusiones. Como segundo componente, el kit comprende uno de los fragmentos capaces de dirigir a la proteína a las inclusiones, que incluyen los siguientes fragmentos de la proteína muNS aviar: 381-448, 448-477, 477-542 y 539-605.

Adicionalmente, el kit de la invención puede comprender una célula adecuada para poner en práctica el kit. Dicha célula puede ser una célula procariota o una célula eucariota. En el kit de la invención puede usarse prácticamente cualquier célula huésped que pueda ser transformada con el polinucleótido de la invención, o que pueda ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante que contenga el polinucleótido de la invención, por ejemplo células animales (tal como células de mamífero, células de aves, células de insecto, etc.), células de plantas, levaduras, etc. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia [Sambrook *et al*., Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001].

Usos terapéuticos de la proteína de fusión de la invención

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión para su uso en medicina, que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

La proteína de fusión comprende un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés. Posibles polipéptidos de interés han sido descritos para el segundo aspecto de la invención, en concreto para la proteína de fusión de la invención de la presente memoria, por lo que se hace referencia a ellos. El segundo componente se selecciona entre un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3), un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4), un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5), o las secuencias correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

El uso en medicina de la proteína de fusión incluye enfermedades tales como las causadas por infecciones virales si se trata de un antígeno viral, enfermedades causadas por infecciones bacterianas si se trata de un antígeno bacteriano, enfermedades causadas por infecciones fúngicas si se trata de un antígeno fúngico, alergias si se trata de un alérgeno, enfermedades causadas por una infestación parasitaria si se trata de un antígeno parasitario y/o un tumor si se trata de un antígeno específico de células tumorales.

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

Enfermedades causadas por infecciones bacterianas que pueden ser tratadas con la proteína de fusión incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por microorganismos del género *Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Staphylococcus, Shigella, Listeria, Aerobacter, Helicobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Heamophilus* o *Bordetella*.

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

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

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

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

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

Asimismo, la proteína de fusión puede utilizarse como vacuna, ya que se pueden integrar proteínas exógenas en las inclusiones y purificarlas. Las inclusiones purificadas constituyen un material particulado y se ha demostrado que los epitopos expuestos en material particulado estimulan la respuesta inmune (Roy, P., 1996. Intervirology 39: 62-71), tanto celular como humoral, de una manera más eficaz que las proteínas aisladas en forma soluble. Por tanto, la proteína de fusión de la invención se puede utilizar para generar partículas que expongan diversos epitopos de interés médico o veterinario y de esta forma utilizarse como vacunas. Las ventajas serían: i) estar constituidas por material particulado; ii) facilidad de producción y purificación; iii) seguridad biológica, ya que no utiliza virus patógenos vivos sino sus componentes proteicos y iv) se pueden exponer en la misma partícula múltiples epitopos diferentes. De esta forma, se pueden integrar en las mismas inclusiones diferentes epitopos inmunogénicos del mismo virus o diferentes epitopos de virus diferentes o de serotipos distintos, lo que ayudaría a mejorar la eficacia de las vacunas generadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una proteína de fusión para la preparación de un medicamento para la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.

Preferiblemente, la proteína de fusión de la invención se usa para el tratamiento de una enfermedad que requiera una activación del sistema inmune en respuesta a un antígeno.

Alternativamente, la invención se relaciona con una proteína de fusión para su uso en la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.

Alternativamente, la invención se relaciona con un método para promover la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto a un antígeno o para el tratamiento de una enfermedad que requiera una activación del sistema inmune que comprende la administración a dicho sujeto de una proteína de fusión.

La expresión "estimulación de la respuesta inmune de un sujeto", según se usa en la presente invención, se refiere a la iniciación de una respuesta inmune contra un antígeno determinado en un individuo en donde dicha respuesta tiene lugar por primera vez como la reactivación de la respuesta inmune en sujetos en donde dicha respuesta inmune ya ha tenido lugar. Se entiende que la respuesta inmune puede implicar tanto una respuesta inmune innata como adaptativa, y puede implicar una respuesta de tipo humoral como celular.

El término "vacuna", según se usa en la presente invención, se refiere a una composición que comprende al menos un antígeno de interés y que permite activar la respuesta inmune de un sujeto a dicho antígeno. El objetivo de las vacunas es activar la inmunidad tanto mediada por células como por anticuerpos.

Así, las vacunas que pueden ser usadas en la invención incluyen vacunas que presentan uno o más antígenos seleccionados del grupo de un antígeno viral, un antígenos bacteriano, un antígeno fúngico, un alérgeno o un antígeno medioambiental y un antígeno tumoral, que se han descrito en las páginas 21-26, donde se mencionaban los polipéptidos de interés que se pueden incluir en la proteína de fusión.

Método para la incorporación de proteínas de interés a inclusiones formadas por la proteína muNS

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el etiquetado de proteínas con determinados dominios de la proteína muNS constituye un método eficiente para dirigir proteínas exógenas a las inclusiones citoplasmáticas generadas por la proteína muNS, sin causar el desmantelamiento de las inclusiones. En concreto, el dominio Intercoil (muNS(477-542)) es el más adecuado para realizar dicho etiquetado, ya que es suficientemente pequeño para no alterar la naturaleza de la proteína de interés y es el que se incorpora más eficientemente a las inclusiones de muNS. Así, tal y como se observa en el Ejemplo 3 y en las figuras 4 y 5, paneles de la derecha, 3 y 5, dicho dominio es capaz de dirigir tanto al epitopo HA como a la proteína verde fluorescente (GFP) a inclusiones de la proteína muNS. Además de no afectar a la integridad de las inclusiones de muNS, la proteína reclutada (GFP) está perfectamente plegada y es activa y funcional, ya que sigue emitiendo su fluorescencia característica. Asimismo, los dominios Coil 1, Coil 2 y muNS (381-448) también se pueden utilizar para dirigir proteínas a las inclusiones de muNS. De esta manera han demostrado que este etiquetado puede utilizarse en diferentes aplicaciones, tales como: i) secuestrar proteínas en las inclusiones; ii) purificar proteínas activas de forma simple; iii) detección de interacciones intracelulares proteína-proteína.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

para incorporar el primer componente a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polipéptido que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

En una forma preferida de realización, el uso de la proteína de fusión de la invención se lleva a cabo usando como segundo componente de la proteína de fusión un polipéptido que comprende los aminoácidos 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero, en cuyo caso las inclusiones son las resultantes de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y no las del polipéptido que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero.

Método de purificación de las inclusiones

Las inclusiones generadas por la expresión de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o por el polipéptido que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores, son fácilmente purificables mediante el método descrito en la sección de "Métodos" de los Ejemplos, tal como se muestra en el Ejemplo 1 y en Ejemplo 6.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con un método de purificación de las inclusiones formadas por un polipéptido seleccionado del grupo: polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero, la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero y una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que comprende:

(a) expresar en una célula dicho polipéptido y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones; y

(b) purificar dichas las inclusiones.

En una realización preferida, dicho método comprende, una primera etapa que comprende expresar en una célula el polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero, o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones. Es decir, el primer paso sería generar las inclusiones en una célula. La construcción de ADN se puede introducir en células huésped usando técnicas bien conocidas tal como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tal como Davis *et al*., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986). El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un vector de plásmido, viral o retroviral. Las células que comprenden la construcción génica pueden haber sido transfectadas de forma transitoria o de forma estable, para lo cual la transfección de la construcción génica se lleva a cabo simultáneamente con un gen que aporte resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia. El proceso de selección de células que contienen alguno o todas las construcciones de ADN de los componentes del primer complejo de la invención integrados de forma estable en el genoma se lleva a cabo mediante un proceso de selección convencional (véase por ejemplo Ausubel, F.M. *et al*., *Current Protocols in Molecular Biology* (1997) 9.5.1-9.5.19). Para ello, se transfectan las células con el vector o mezclas de vectores y, tras un periodo de recuperación, se dejan crecer en un medio selectivo (bien un medio que contiene al antibiótico frente al que el reportero confiere resistencia o bien un medio mínimo que contiene el antimetabolito frente al cual el reportero confiere resistencia). Las colonias celulares que crecen en medio selectivo se aíslan y se vuelven a dejar crecer en medio selectivo.

Con el fin de generar con éxito las inclusiones en una célula, dicha célula se tiene que mantener en condiciones adecuadas para que la formación de inclusiones se vea favorecida, tal como las condiciones descritas en el apartado "Medios de cultivo" de los Ejemplos, para células de insecto. Un experto en la materia sabría qué tipo de condiciones son las óptimas para cada tipo celular donde se expresen las inclusiones. Se elegirán los medios y condiciones de cultivo apropiados para la producción de las inclusiones; dichos medios y condiciones de cultivo son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La elección de dichos medios y condiciones de cultivos dependerá del microorganismo o línea celular elegida para la producción de las inclusiones.

Con el fin de comprobar si las inclusiones se han formado de una manera adecuada, el experto en la materia sabría qué métodos utilizar. Métodos adecuados para determinar si se han generado las inclusiones incluye, pero no se limita, al método descrito en el Ejemplo 1 de la presente invención basado en la expresión de las inclusiones en una célula y por inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos policlonales contra muNS, se puede comprobar la formación de dichas inclusiones.

Una vez formadas las inclusiones en la célula, la segunda etapa consiste en la purificación de dichas inclusiones, para ello, el primer paso sería la lisis de la célula por sonicación o por cualquier otro método conocido por el experto en la materia. Las inclusiones se obtienen tras una centrifugación en el pellet o precipitado, que posteriormente se resuspenderán en un tampón adecuado. En una realización preferida, el método de purificación de inclusiones es el descrito en la sección de "Métodos" de los Ejemplos.

Se conocen distintos protocolos para la purificación de cuerpos de inclusión. Típicamente, la purificación de cuerpos de inclusión implica la extracción, separación y/o purificación de cuerpos de inclusión mediante la disrupción de células bacterianas, por ejemplo, mediante la incubación en una solución tampón de 50 mM Tris/HCl 50 mM pH 7.5, 50 mM NaCl 50 mM, $MgCl_2$5 mM, DTT 1 mM, 0.1 mM ATP 0.1 mM y 1 PMSF 1 mM. La suspensión celular se

puede lisar mediante varios pases en una prensa francesa, mediante homogeneización usando un Politrón, o mediante sonicación. Otros métodos para la lisis de bacterias son ampliamente conocidos para el experto en la materia (see, e.g., Sambrook *et al*, *supra*; Ausubel *et al*, *supra*).

Método de purificación de proteínas de la invención

Las inclusiones generadas por la expresión de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o por el polipéptido que comprende los aminoácidos 448 a 635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores, son fácilmente purificables, por lo que si se dirige selectivamente un polipéptido de interés a dichas inclusiones también se podría purificar dicho polipéptido de interés de una manera sencilla y eficiente, tal como se muestra en el ejemplo 6, en donde se purifica la proteína GFP etiquetada con el dominio Intercoil. Además, dichas proteínas purificadas mantienen su actividad biológica.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con un método de purificación de un polipéptido, en adelante método de purificación de la invención, que comprende un polipéptido de interés que comprende:

(a) expresar en una célula el polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero, o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(b) un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(c) un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(d) un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en condiciones adecuadas para que se produzca interacción entre las inclusiones generadas en la etapa (a) y el segundo componente de la proteína de fusión; y en donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en cualquier orden,

(e) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión; y

(f) separar la proteína de fusión de las inclusiones.

La etapa (a) de dicho método se ha explicado en la sección previa de “Método de purificación de inclusiones”, por lo que se hace referencia a dicha explicación.

Una vez que se dispone de una línea celular que genera inclusiones adecuada para la realización del método de purificación de la invención, se procede a la expresión en dicha célula de una proteína de fusión que comprende un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés y un segundo componente adecuado para dirigir al o a los polipéptido/s de interés a las inclusiones y que se selecciona del grupo de:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(b) un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(c) un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(d) un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

El polipéptido de interés se ha descrito anteriormente en la sección anterior de la proteína de fusión de la invención, así como los fragmentos que se pueden dirigir a las inclusiones.

El resultado de las dos primeras etapas del método de purificación de la invención sería la unión del polipéptido de interés a las inclusiones, a través de uno de los fragmentos descritos anteriormente que presentan afinidad por las inclusiones.

Estos dos primeros pasos se pueden realizar en diferente orden, (a) una opción sería tal como se ha descrito en el método de purificación de la invención, es decir, primeramente se generan las inclusiones y en segundo lugar se expresa en dicha célula la proteína de fusión o bien (b) expresar en una célula la proteína de fusión en primer lugar y después generar las inclusiones en dicha célula.

Una vez generadas las inclusiones y expresada la proteína de fusión en la misma célula, el siguiente paso es purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión. Para ello, se recurre típicamente a métodos para la purificación de cuerpos de inclusión tal y como se ha descrito anteriormente en el contexto del método de purificación de las inclusiones de la invención. Una vez que se disponga de una preparación de cuerpos de inclusión, estos pueden ser solublizados usando agentes del tipo de urea (de 4 M a 8 M), formamida (al menos un 80% v/v) e hidrocloruro de guanidinio (de 4 M a 8 M). Algunos solventes que son capaces de solubilizar agregados incluyen, por ejemplo, SDS y ácido fórmico aunque su uso es inadecuado debido a la falta de inmunogenicidad y/o actividad. Una vez que se han solubilizado los cuerpos proteicos, las proteínas pueden ser solubilizadas mediante la eliminación (mediante diálisis, por ejemplo) o dilución del agente desnaturalizante, permitiéndose así la formación de proteínas activas inmunológica- o biológicamente activas.

Un experto en la materia conocerá los diferentes métodos para la purificación del polipéptido de interés unido a las inclusiones. Métodos adecuados para purificar dicho complejo incluye, pero no se limita, al protocolo de purificación de GFP-Intercoil en células de insecto sf9 infectadas con baculovirus se ha descrito en el Ejemplo 6 de la presente memoria. Principalmente, el método consiste en la lisis de las células, la sonicación del extracto y en el pellet se purifican las inclusiones con GFP-Intercoil unido. Con el fin de comprobar si la purificación ha tenido éxito, se podría llevar a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, comprobando que el polipéptido de interés se encuentra presente en el extracto tras la purificación.

El último paso del método de purificación de la invención consiste en la separación del polipéptido de interés de las inclusiones. Primeramente, se procedería a la separación de la proteína de fusión de las inclusiones, que se lleva a cabo de una manera sencilla con un tampón hipotónico, utilizando una concentración de NaCl de alrededor de 0,5 M, obteniendo la proteína de fusión en solución con una alta pureza. Una vez separadas las inclusiones de la proteína de fusión, se procede a la separación de los dos componentes de la proteína de fusión. Para ello el primer y segundo componente de la proteína de fusión pueden estar conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa. Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen enteroquinasa (sitio de corte DDDDK), factor Xa (sitio de corte IEDGR), trombina (sitio de corte LVPRGS), proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG), proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP), internas y similares. Un experto en la materia conocería las condiciones específicas de corte de cada una de las proteasas. En una realización preferida, la separación se lleva a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 6.

En una realización particular, si el segundo componente de la proteína de fusión en el método de purificación comprende los aminoácidos 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero, entonces las inclusiones expresadas en la etapa (a) son las resultantes de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

Método para identificar interacciones proteína-proteína

La posibilidad de dirigir proteínas de interés a las inclusiones formadas por muNS y muNS-Mi tiene múltiples aplicaciones potenciales además de la purificación de proteínas. Una de ellas es identificar interacciones entre proteínas en el interior de células eucariotas. Así, si se etiqueta un polipéptido de interés con uno de los dominios descritos anteriormente para dirigirlo a los cuerpos de inclusión, éste podrá atraer otros polipéptidos que interaccionen fuertemente con él y relocalizarlos en las inclusiones, tal como se muestra en el Ejemplo 7, en donde se incorpora el antígeno T a los cuerpos de inclusión de muNS-Mi por unión a p53 que se había etiquetado con el dominio intercoil.

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

(a) expresar en una célula el polipéptido que comprende los aminoácidos 448-635 (SEQ ID NO: 1) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero, o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula la proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene el primer polipéptido; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones expresadas en la etapa (a);

(c) expresar en una célula el segundo polipéptido o bien mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido;

en donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo en cualquier orden y

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

Las dos primeras etapas del método para la detección de interacciones de la invención coinciden con las dos primeras etapas del método de purificación de la invención, por lo que se hace referencia aquí a dichas etapas.

Una vez que se han expresado en la misma célula las inclusiones y la proteína de fusión que comprende el primer polipéptido y se ha formado el complejo entre las inclusiones y el primer polipéptido, se procede a expresar en dicha célula el segundo polipéptido. Asimismo, el orden de las etapas (a), (b) y (c) puede variar, de manera que se exprese en primer lugar el segundo polipéptido o el primero, en lugar de las inclusiones. La expresión del segundo polipéptido se llevará a cabo de manera similar al primer polipéptido, de manera que se hace referencia a la etapa (b) del método de purificación de la invención.

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

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

Dicho método para la detección de la interacción de polipéptidos puede incluir la detección de la interacción de más de dos polipéptidos. Así, mediante el sistema de interacción a través de las inclusiones, se podría favorecer el ensamblaje de complejos supramoleculares en las células para su estudio estructural. Muchos complejos molecula-

res que están formados por múltiples proteínas son difíciles de obtener mediante los sistemas clásicos de expresión de proteínas. Probablemente, la posible dispersión de sus componentes individuales en la célula pueda dificultar la formación de dichos complejos. De manera natural, los viriones de reovirus son complejos supramoleculares que se ensamblan de una manera extremadamente eficiente en la célula infectada. Para aumentar dicha eficiencia, los componentes de los viriones son reclutados a las inclusiones de muNS de una manera ordenada y selectiva (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74). De esta forma, al concentrarse en el mismo compartimento, aumentan las posibilidades de encontrar los ligandos adecuados. El presente método para la detección de la interacción de polipéptidos permite simular la morfogénesis de los reovirus, pero con proteínas exógenas que se pueden dirigir de forma selectiva a las inclusiones de muNS o muNS-Mi. Para ello, dichos polipéptidos se pueden etiquetar con uno de los dominios mencionados anteriormente y dirigir varias proteínas de a las inclusiones de una manera sencilla y así incrementar sus posibilidades de encontrar los ligandos adecuados para el ensamblaje de complejos.

En una realización particular, el método para la detección de interacciones de la invención se puede utilizar para determinar la interacción entre proteínas nucleares. Con el fin de que las inclusiones se formen en el interior del núcleo, se tiene que añadir al polipéptido de la invención o bien a la proteína muNS completa del reovirus de mamífero o del reovirus aviar, una señal de localización nuclear. Ejemplos de secuencias de localización nuclear se indican en la sección de "Mínima región de la proteína muNS capaz de formar inclusiones", por lo que se hace referencia aquí a dicha explicación. En una realización particular, el péptido de señalización nuclear es la NLS del antígeno T (PKKKRKV) o a NLS del antígeno T (PKKKRKV) fusionada con la proteína VP16 del herpesvirus.

Asimismo, además de un péptido de señalización nuclear, en una realización particular, el polipéptido de la invención que se expresa en la célula de la etapa (a) comprende un péptido para facilitar su purificación. Dichos péptidos para facilitar su purificación ya han sido mencionados previamente en el apartado "Mínima región de la proteína muNS capaz de formar inclusiones" y aquí se hace referencia a ellos.

En una realización particular, la proteína de fusión incluida en la célula de la etapa (b) y/o el segundo polipéptido incluido en la célula de la etapa (c) del método para la detección de interacciones de la invención, comprenden un péptido para facilitar su purificación o un péptido de señalización nuclear. Dichos péptidos se han explicado anteriormente a lo largo de la memoria, por lo que se hace referencia a ellos.

En una realización particular, en la etapa (d) del método para la detección de interacciones de la invención, se determina si ha existido interacción entre el primer polipéptido y el segundo, es decir si el segundo polipéptido se encuentra asociado al complejo formado por las inclusiones y el primer polipéptido, por la aparición o detección del segundo polipéptido en el núcleo. Debido a la interacción entre ambos polipéptidos, el segundo polipéptido modifica su localización y se transloca desde el citoplasma al núcleo, uniéndose al complejo formado por las inclusiones y el primer polipéptido.

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

Ejemplos

Materiales y Métodos

Células

Para las transfecciones se usaron cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF), preparados tal y como se describe en el apartado de Métodos. También se usaron células Cos-7. Para expresar proteínas con baculovirus se utilizaron células de insecto Sf9.

Anticuerpos

El anticuerpo policlonal contra la proteína muNS SI 133 de reovirus aviar fue obtenido previamente por los mismos inventores (Touris-Otero *et al*. Virology, 319; 94-106). También se emplearon diferentes anticuerpos comerciales:

- Anticuerpo monoclonal contra la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* (Roche, Barcelona, España).

- Anticuerpo policlonal de conejo específico contra el epítopo de la hemaglutinina del virus Influenza (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

- Anticuerpo monoclonal contra p53 (clon PAB40) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

- Anticuerpo monoclonal contra el antígeno T del SV40 (clon PAb101) (BDbiosciences, Madrid, España).

- Anticuerpos anti-IgG de conejo y de ratón conjugados a peroxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España) empleados para la detección indirecta por Western usando el sustrato de HRP ("horseradish peroxidase") quimioluminiscente de Millipore (Madrid, España).

- Anticuerpos anti-IgG de conejo y de ratón conjugados a Alexa 488 y a Alexa 594, respectivamente (Sigma-Aldrich, Madrid, España), empleados como anticuerpos secundarios en las inmunofluorescencias.

Bacterias

DH5-α: Cepa bacteriana de *E. coli* utilizada para el crecimiento y purificación de plásmidos. Genotipo: supE44, Δ lacU169(φ801acZ ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Hanahan, 1983).

DH10Bac: Cepa bacteriana de *E. coli* usada para generar baculovirus recombinantes. Genotipo: F-mcrA D(mrrhs-dRMS-mcrBC) φ80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, 27leu)7697 galU galK λ-rpsL nupG/ bMON14272/pMON7124 (Invitrogen, Barcelona, España).

XL1-Blue: Cepa bacteriana de *E. coli* usada para clonar los productos de PCR en los plásmidos correspondientes. Genotipo: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB laclqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, La Jolla, Calif.). Para hacer competentes y transformar estas células, se siguió el protocolo descrito por Chung *et al* (1989) (Chung *et al*. 1989. PNAS 86: 2172-5).

Plásmidos

pCDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Barcelona, España): vector de expresión en células eucariotas que permite la expresión de genes clonados de manera transitoria bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pFastBacI (Invitrogen, Barcelona, España): vector con transposón bacteriano Tn7, que permite insertar la secuencia clonada en un bácmido al transformarlo en DH10Bac.

pEGFP-C1 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión en células eucariotas de proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en su extremo amino. El promotor, como en pCDA3.1/Zeo, es el de citomegalo virus.

pEGFP-N1 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión en células eucariotas de proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en su extremo carboxilo. El promotor, como en pEGFP-C1, es el de citomegalo virus.

pCINeo (Promega, Madrid, España): vector de expresión en células eucariotas que permite la expresión de genes clonados de manera transitoria bajo el promotor temprano de citomegalo virus.

pVP16 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión en células eucariotas de proteínas fusionadas en su extremo amino a una proteína del virus herpes (VP16) que actúa como un activador transcripcional, y además contiene acoplada una NLS ("nuclear localization sequence") del antígeno T del SV40. El promotor temprano es el del SV40.

Medios de cultivo

Los fibroblastos embrionarios de pollo se incubaron en medio 199 (1x) (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 10% (w/v) de caldo de triptona fosfato (TPB) y 5% (v/v) de suero bovino.

Las células Sf9 se crecieron en suspensión en medio Sf900II libre de suero o en monocapa en medio Sf900II suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal a 28ºC (Invitrogen, Barcelona, España).

Las células Cos-7 se crecieron en medio D-MEM (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal.

Las bacterias se crecieron en medio LB o LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado (Sambrook *et al*., Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001), excepto cuando se transformaron DH10Bac, ya que el protocolo comercial recomienda usar medio SOC (Sambrook *et al*., Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001) para mejorar la eficiencia de transformación/transposición.

Métodos

Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)

Estas células se obtuvieron a partir de embriones de pollo tras 9-10 días de incubación (cedidos por Intervet, Salamanca). Se lavó la cáscara del huevo con etanol, colocándose sobre un soporte con el extremo más ancho hacia arriba. Se abrió el cascarón con pinzas estériles y se rompió la membrana corialantoidea para penetrar en la cavidad amniótica. El embrión extraído se decapitó y evisceró. El tejido resultante se lavó 3x con PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4) a 37ºC y se troceó con unas tijeras. La papilla resultante se digirió con tripsina (10 ml de tripsina, 0,25% en PBS por embrión) a 37ºC durante 45 min. Luego se pasó a través de una rejilla, se añadió un volumen igual de medio 199 y se centrifugó 25 min a 1500 g. El pellet resultante se resuspendió en medio

199 precalentado a 37ºC y suplementado con 10%) TPB (caldo de triptosa fosfato), 75% de suero bovino, antibióticos y fungizona. La suspensión celular se sembró en placas incubadas a 37ºC.

Expresión transitoria de proteínas en células eucariotas

Los plásmidos conteniendo las diferentes construcciones se transfectaron en células CEF o Cos-7 semiconfluyentes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando "Lipofectamine Plus Reagent" (Invitrogen, Barcelona, España). A menos que se indique lo contrario, las células se analizaron a las 24 horas postransfección (hpt).

Inmunofluorescencias

Células crecidas sobre cubreobjetos redondos en un multipocillo de 12 se transfectaron o infectaron, según se indica en el texto. Tras lavar con PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4), se fijaron con paraformaldehido durante 15 minutos. Las células fijadas se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h. en tampón bloqueante (3% BSA (Sigma, Madrid, España), 0,1% Tritón X-100 en PBS). Los cubreobjetos se incubaron durante 1 h con anticuerpos primarios, diluidos previamente 1:1000 en tampón bloqueante. Las células se lavaron entonces tres veces con PBS (10 min. cada lavado) y se incubaron 30 min. más con los anticuerpos secundarios (1:1000) y DAPI (Sigma) diluidos en tampón bloqueante. Los cubreobjetos se lavaron con PBS seis veces (5 min. cada lavado) y se montaron sobre portaobjetos con una gota de de medio de montaje (6 g glicerol; 2,4 g mowiol; 6 ml H_2O y 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Olympus DP-71 montada sobre un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las fotos obtenidas se procesaron con Adobe Photoshop (Adobe Systems, California, USA).

Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las muestras se mezclaron con un tercio de su volumen de tampón Laemmli de electroforesis (62,5 mM Tris-HCl, pH6,8; 17% glicerol; 0,1 M β-mercaptoetanol; 2% SDS; 0,024%) azul de bromofenol) y se hirvieron durante 3 min. Posteriormente, se analizaron mediante la técnica de la electroforesis discontinua en presencia de SDS (SDS-PAGE) desarrollada inicialmente por Laemmli (1970). La visualización de las proteínas se hizo con azul Coomassie al 0,1%. En algunas ocasiones los geles no se fijaron, sino que se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Madrid, España) para analizarlo por Western-Blot.

Transferencia de proteínas y Western-Blot

Se cortaron cuatro trozos, del tamaño del gel a transferir, de papel Whatman 3MM y uno de PVDF (Millipore, Madrid, España) y se sumergieron en tampón de transferencia (25 mM Tris base; 192 mM Glicina; 20% Metano 1), así como el gel de poliacrilamida con las proteínas que queremos transferir. Después de media hora se prepara el "sandwich" para la transferencia. La transferencia se lleva a cabo en una célula Trans-Blot de Bio-Rad, aplicando 100 V durante 1 h. Para comprobar la efectividad de la transferencia se usaron marcadores de peso molecular preteñidos (Invitrogen, Barcelona, España). La membrana de PVDF, con las proteínas ya transferidas, se incubó durante un mínimo de una hora en PBS conteniendo 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% de Tween 20 (blotto), a fin de bloquear todos los lugares de unión a la membrana. A continuación, se añadió el anticuerpo primario (diluido 1:10000 en blotto en el caso del anti-muNS o 1:1000 en el caso de GFP) y se incubó durante 1 h, tras lo cual se hicieron tres lavados de 5 min con blotto para retirar el anticuerpo no unido. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 30 min. y se repitieron los lavados para eliminar el anticuerpo secundario. Los Western-blot se revelaron usando el sustrato de HRP ("horseradish peroxidase") quimioluminiscente de Millipore (Madrid, España).

Construcciones de plásmidos

La construcción del plásmido recombinante pCINeo-M3, que expresa la proteína muNS del reovirus aviar S1133, ha sido descrita previamente (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341,361-74).

Para la construcción del plásmido recombinante pVP16-muNS, que expresa muNS fusionada al extremo carboxilo de un dominio de activación (VP16), y que lleva acoplada la NLS del Antígeno T del SV40 (designada como VP16-muNS) se amplificó por PCR el plásmido pGEMT-M3 con los siguientes cebadores: SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. El producto de PCR resultante se digirió y se clonó en el vector pVP16.

Para obtener el plásmido recombinante pVP16-GFP-muNS, que expresa la quimera GFPmuNS fusionada al extremo carboxilo de un dominio de activación que contiene la NLS del antígeno T (denominada VP16-GFP-muNS en adelante), el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. El producto de PCR resultante se digirió con BamHI y XbaI y posteriormente se ligó al plásmido pVP16, el cual se cortó con las mismas enzimas. La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

Para generar el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T-muNS, que expresa la proteína muNS fusionada con la NLS del antígeno T en su extremo amino (denominada NLSAg.T-muNS en Resultados), el plásmido

recombinante pGEMT-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 12. El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y XbaI y posteriormente se ligó al plásmido pCDNA3.1/Zeo, el cual se digirió con las mismas enzimas. La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

Para obtener el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T-GFP-muNS, que expresa la quimera GFP-muNS fusionada a la NLS del antígeno T en su extremo amino (denominada NLS-Ag.T-GFP-muNS en adelante), el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 12. El producto de PCR resultante se digirió con BamHI y XbaI y posteriormente se ligó al plásmido pCDNA3.1/Zeo, el cual se cortó con las mismas enzimas. La construcción obtenida fue se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

Para generar el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T-GFP-muNS(448-635), que expresa la quimera GFP-muNS (448-635) (también denominada GFP-muNS-Mi en adelante) fusionada con la NLS del antígeno T en su extremo amino (denominada NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi en adelante), el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3(448-635) se amplificó por PCR con los mismos cebadores que en el caso anterior (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 12). El producto de PCR resultante se digirió con BamHI y XbaI y posteriormente se ligó al plásmido pCDNA3.1/Zeo, el cual se cortó con las mismas enzimas. La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

El vector pEGFP-N1 (BD Biosciences, Madrid, España) se utilizó para expresar la fusión de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) de A. victoria al extremo carboxilo de la región de muNS, que comprende los aminoácidos 381 a 448 (muNS(381-448)). Para ello, el plásmido recombinante (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y BamHI y posteriormente se ligó al plásmido pEGFP-N1, el cual se cortó con las mismas enzimas. La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

El vector pEGFP-C1 (BD Biosciences, Madrid, España) se utilizó para expresar fusiones de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) de A. victoria al extremo amino de determinadas regiones de muNS. La construcción del plásmido recombinante pEGFP-C1-M3, que expresa la proteína muNS del reovirus aviar S1133 fusionada a GFP en su extremo amino (denominada GFP-muNS en adelante), ha sido descrita previamente (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74). La generación del plásmido recombinante pEGFP-C1-M3 (448-635), que expresa la región que abarca los residuos de 448 a 635 de la proteína muNS del reovirus aviar S1133 fusionada a GFP en su extremo amino (denominada GFP-muNS-Mi en adelante) se lleva a cabo por amplificación de la región muNS (448-635), usando como molde pGEMTM3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) a partir de los cebadores SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21 (véase Tabla 1).

Para expresar la EGFP fusionada al extremo amino de diferentes regiones de muNS, se introdujeron dianas para EcoRI y BamHI con los cebadores durante la amplificación por PCR en la región del gen M3 que se quería amplificar. Las PCRs se realizaron usando como molde pGEMTM3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) y los cebadores están listados en la Tabla 1. Los productos de PCR se cortaron con EcoRI y BamHI y posteriormente se ligaron a pEGFP-C1, el cual se cortó con las mismas enzimas. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS y GFP (datos no mostrados).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Construcción de quimeras de muNS con GFP

Construcción	**Cebadores (5'-3')[1]**	**Proteína[2]**	**Tamaño (kDa)[3]**
pGEFP-C1-M3(1-477)	F-SEQ ID NO:15 R- SEQ ID NO:16	GFP/muNS(1-477)	81,0
pGEFP-C1-M3(1-448)	F- SEQ ID NO:15 R- SEQ ID NO:17	GFP/muNS(1-448)	77,8
pGEFP-C1-M3(1-380)	F- SEQ ID NO:15 R- SEQ ID NO:18	GFP/muNS(1-380)	70,6
pGEFP-C1-M3(1-154)	F- SEQ ID NO:15 R- SEQ ID NO:19	GFP/muNS(1-154)	45,4
pGEFP-C1-M3(448-635)	F- SEQ ID NO:20 R- SEQ ID NO:21	GFP/muNS(448-635)	49,5
pGEFP-C1-M3(605-635)	F- SEQ ID NO:22 R- SEQ ID NO:21	GFP/muNS(605-635)	31,3
pGEFP-C1-M3(448-477)	F- SEQ ID NO:20 R- SEQ ID NO:16	GFP/muNS(448-477)	31,3
pGEFP-C1-M3(477-542)	F- SEQ ID NO:23 R- SEQ ID NO:24	GFP/muNS(477-542)	35,7
pGEFP-C1-M3(539-605)	F- SEQ ID NO:25 R- SEQ ID NO:26	GFP/muNS(539-605)	36,0
pGEFP-C1-M3(381-448)	F- SEQ ID NO:27 R- SEQ ID NO:17	GFP/muNS(381-448)	35,3

[1] *Al cebador inverso (R) se le añadió un codón stop y al cebador directo un codón de iniciación. Las dianas de EcoRI o BamHI están incorporadas en el extremo 5´ de los cebadores.*

[2] *En cada una de las quimeras, GFP se fusionó al extremo amino de la región de muNS indicada.*

[3] *Tamaño esperado para las proteínas de fusión expresadas.*

Para expresar la EGFP fusionada al extremo N-terminal de la región de muNS que comprende los residuos 477 a 542, de manera que contenga un lugar de corte para el factor Xa entre ambas proteínas, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 24. El producto de PCR resultante se cortó con EcoRI y BamHI y posteriormente se ligó al vector pEGFP-C1, el cual se cortó con las mismas enzimas. La construcción generada (pEGFP-C1-Xa-muNS(477-542) se verificó mediante secuenciación y Western-blot, usando anticuerpos contra muNS y GFP (datos no mostrados).

Para expresar regiones de muNS fusionadas a la hemaglutinina del virus Influenza (HA) en su extremo C-terminal, la secuencia codificante del epítopo, los codones de iniciación y terminación y las dianas de enzimas de restricción se introdujeron con los cebadores durante la amplificación por PCR en la región del gen M3 que se quería amplificar. Las PCRs se realizaron usando como molde pGEMT-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) y los cebadores listados en la Tabla 2. Los productos de PCR se cortaron con EcoRI y XbaI y posteriormente se ligaron a pCDNA3.1/Zeo, el cual se digirió con las mismas enzimas. Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación y Western-blot usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

TABLA 2

Construcción de quimeras de muNS con HA

Construcción	**Cebadores (5'-3')[4]**	**Proteína[5]**	**Tamaño (kDa)[6]**
pCDNA3.1/Zeo -M3(1-154)-HA	F-SEQ ID NO:29 R- SEQ ID NO:30	muNS(1-154)-HA	18,3
pCDNA3.1/Zeo -M3(1-380)-HA	F- SEQ ID NO:31 R- SEQ ID NO:32	muNS(1-380)-HA	43,4
pCDNA3.1/Zeo -M3(1-448)-HA	F- SEQ ID NO:33 R- SEQ ID NO:34	muNS(1-448)-HA	50,6
pCDNA3.1/Zeo -M3(1-477)-HA	F- SEQ ID NO:35 R- SEQ ID NO:36	muNS(1-477)-HA	53,8
pCDNA3.1/Zeo-M3(539-635)-HA	F- SEQ ID NO:37 R- SEQ ID NO:38	muNS(539-635)-HA	12,3
pCDNA3.1/Zeo-M3(539-605)-HA	F- SEQ ID NO:39 R- SEQ ID NO:40	muNS(539-605)-HA	9,2
pCDNA3.1/Zeo-M3(477-542)-HA	F- SEQ ID NO:41 R- SEQ ID NO:42	muNS(477-542)-HA	8,8
pCDNA3.1/Zeo-M3(381-448)-HA	F- SEQ ID NO:43 R- SEQ ID NO:44	muNS(381-448)-HA	8,2

[4] *Al cebador negativo (R) se le añadió un codón stop y al cebador positivo un codón de iniciación. Las dianas de EcoRI o BamHI están incorporadas en el extremo 5´ de los cebadores.*

[5] *En cada una de las quimeras, GFP se fusionó al extremo amino de la región de muNS indicada.*

[6] *Tamaño esperado para las proteínas de fusión expresadas.*

Los plásmidos pCMV-wtAgT (que expresa la versión larga del antígeno T) y pCMV-wtp53 (que expresa la p53 humana salvaje) fueron cedidos por el Dr. J.B. Zalvide (Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, USC).

Para expresar la proteína p53 humana fusionada al extremo N-terminal de la región de muNS que comprende los residuos 477 a 542, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Touris-Otero *et al*. 2004, J. Mol. Biol. 341, 361-74) se amplificó por PCR con los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46. El producto de PCR resultante se digirió con ApaI y XbaI y posteriormente se ligó al plásmido pCDNA3.1/Zeo, el cual se cortó con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-muNS(477-542). A continuación, la secuencia codificante completa de p53 humana se amplificó mediante PCR usando como molde pCMV-wtp53 y los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48. El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo-muNS (477-542) se digirieron con BamHI y EcoRI y se ligaron, generándose el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-p53-muNS(477-542). La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot usando anticuerpos contra muNS y p53 (datos no mostrados).

Para expresar la proteína HaloTag fusionada al extremo N-terminal de la región de muNS que comprende los residuos 477 a 542, la secuencia codificante completa de HaloTag se amplificó mediante PCR usando como molde el plásmido pHT2 (Promega, Madrid, España) y los siguientes cebadores: el cebador positivo de SEQ ID NO: 53 y el cebador negativo SEQ ID NO: 54. El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo-muNS(477-542) se digirieron con BamHI y NotI y se ligaron, generándose el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-HaloTag-muNS (477-542). La construcción obtenida se verificó mediante secuenciación y Western-blot usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados).

Construcción de baculovirus recombinantes

La construcción del baculovirus recombinante Bac-muNS, que expresa la proteína muNS del reovirus aviar S1133, se realizó amplificando el plásmido pGEMT-M3 con los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 8.

La construcción del baculovirus recombinante pCINeo-M3 (448-635), que expresa la región que abarca los residuos de 448 a 635 de la proteína muNS del reovirus aviar S1133 (denominada muNS-Mi en adelante), se realizó a partir del plásmido pGEMT-M3, amplificando por PCR, utilizando los cebadores de secuencia SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. El producto de PCR resultante se digirió y se clonó en los sitios EcoRI y XbaI del vector pFastBac1 (Bac-to-Bac system; Invitrogen, Barcelona). El pFastBac1-muNS (448-635) se utilizó para generar el baculovirus recombinante Bac-muNS (448-635).

Para expresar la proteína recombinante GFP-Xa-muNS(477-542) en células de insecto (denominada Bac-GFP-Intercoil en adelante), la secuencia codificante de GFP-Xa-muNS(477-542) presente en el plásmido pEGFP-C1-Xa-muNS(477-542) se amplificó por PCR utilizando los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50. El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y XbaI del pFastBac1 (Bac-to-Bac system; Invitrogen, Barcelona, España) para obtener el pFastBac1-GFP-Xa-muNS(477-542), el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP-Xa-muNS(477-542), tal y como recomienda el fabricante en sus instrucciones. Este baculovirus expresa el gen GFP-Xa-muNS(477-542) bajo el control del promotor de la polihedrina.

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la proteína GFP, la secuencia codificante de GFP se amplificó por PCR usando como molde el vector pEGFP-C1 y los cebadores cuya secuencia es SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52. El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de EcoRI y XbaI del pFastBac1 (Bac-to-Bac system; Invitrogen, Barcelona, España) para obtener el pFastBac1-GFP, el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP, tal y como recomienda el fabricante en sus instrucciones. Este baculovirus expresa el gen de GFP bajo el control del promotor de la polihedrina.

Protocolo de purificación de las inclusiones

Tras determinar el título de los diferentes baculovirus recombinantes utilizados en este trabajo se co-infectaron con 5 ufp/célula (controles negativos: Bac-muNS/Bac-GFP o Bac-muNS-Mi/Bac-GFP; o muestra objeto de estudio: Bac-muNS/Bac-GFP-Xa-Intercoil o Bac-muNS-Mi/Bac-GFP-Xa-Intercoil) un frasco con células Sf9 en suspensión ($1{,}5x10^6$ células/ml) con una viabilidad superior a 99%. Las células se mantuvieron en un Erlenmeyer agitándose a 120 rpm a 28ºC durante tres días (punto en el cual las proteínas que se expresan bajo el promotor de la polihedrina suelen alcanzar su máximo), y después se centrifugaron 10 min. a 1000 x g. El pellet se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) y se puso en hielo durante 15 min. para facilitar el lisado de las células.

El extracto celular resultante se centrifugó a 2000 x g/10 min. a 4ºC, y el pellet resultante se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico y se centrifugó a 2000 x g durante 10 min., lavándose dos veces en un volumen de 10 ml de tampón hipotónico. Posteriormente, el pellet se resuspendió en el mismo volumen de tampón hipotónico y se sonicó (45 ciclos de 6 pulsos, 0,5 ciclos y amplitud 50), con el objetivo de romper los núcleos celulares y fragmentar el ADN. El extracto sonicado se centrifugó a 4ºC a 200 x g durante 5 min. y el pellet se resuspendió en 5 ml de tampón hipotónico y se lavó 5 veces en el mismo volumen de tampón hipotónico (200 xg/5 min.). Posteriormente, el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de tampón hipotónico en el caso de los controles negativos (Bac-muNS/Bac-GFP y Bac-muNS-Mi/Bac-GFP) y en tampón hipotónico con 500 mM de NaCl en el caso de las muestras objeto de estudio (BacmuNS/Bac-GFP-Xa-Intercoil o Bac-muNS-Mi/Bac-GFP-Xa-Intercoil). La muestra resuspendida en sal se centrifugó 5 min. a 16000 x g, para eliminar los restos insolubles y el sobrenadante se pasó a través de una columna de desalado (HiTrap™ Desalting Column, GE Healthcare, Madrid, España). El eluído se centrifugó 5 min. a 16000 x g, para eliminar los restos insolubles, quedándonos con el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante que contenía mayoritariamente GFP-Xa-Intercoil (ver Ejemplo 6) se incubó con Factor Xa (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) (dilución 1/1000) y tras dos días de tratamiento se centrifugó 5 min. a 16000 x g, en el sobrenadante es donde se observó que la mayor parte GFP-Xa-Intercoil había sido cortada obteniéndose GFP (ver Ejemplo 6). Para confirmar que toda la GFP-Xa-Intercoil se había digerido, se incubó un día más con el factor Xa, se centrifugó 5 min. a 16,000 x g y el sobrenadante resultante se cargó en una columna de Q-Sepharose (GE Healthcare, Madrid, España) pre-equilibrada con tampón hipotónico (10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$). La columna se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl y las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE, detectándose la presencia de GFP en la elución de 400 mM de NaCl (datos no mostrados). Finalmente, la proteína se concentró y se cargó en un gel, observándose una única banda de unos 30 kDa, que mediante Western-blot, se comprobó que se trataba de GFP.

Este protocolo de purificación es el que se ha utilizado a lo largo de toda la memoria para aislar o purificar las diferentes inclusiones generadas por la invención.

Ejemplo 1

Mínima región de la proteína muNS capaz de formar inclusiones

Si las inclusiones se generan exclusivamente por las interacciones entre muNS-muNS, cada monómero de muNS debería contener varios dominios que interaccionaran con ellos mismos, necesarios para construir la red tridimensional requerida para construir una inclusión. Con el fin de identificar los dominios de muNS del Orthoreovirus aviar necesarios para la formación de inclusiones, se construyeron y transfectaron en células CEF los plásmidos que expresaban los mutantes de deleción en C-terminal y N-terminal (mostrados en las Figuras 1 y 2). La capacidad de las construcciones de formar inclusiones citoplasmáticas globulares se analizó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos

policlonales contra muNS. Se utilizaron anticuerpos conjugados con ubiquitina y anti-vimentina para discriminar entre inclusiones y estructuras que contenían proteína agregadas/mal plegadas (se muestran algunos ejemplos en la Figura 2B).

En primer lugar, se comprobaron las truncaciones C-terminal mostradas en la Figura 1. Ninguna de las proteínas truncadas parecía agregar o tener un plegamiento incorrecto, ya que no co-localizaban con la ubiquitina conjugada o inducían re-distribución de la vimentina inducida (datos no mostrados). Sorprendentemente, ninguna de las truncaciones en C-terminal analizadas era capaz de formar inclusiones, sino que mostraban una distribución intracelular difusa. Estos resultados indican que las secuencias en el extremo C-terminal de muNS son muy importantes para formar inclusiones.

El siguiente paso fue evaluar la importancia de las secuencias N-terminal analizando la capacidad para formar inclusiones de las truncaciones N-terminal que se muestran en la Figura 2A. La deleción de hasta 140 residuos del extremo N-terminal de la proteína muNS no afectaba adversamente la capacidad de la proteína viral de formar inclusiones y no alteraban la morfología de las inclusiones (Figura 2A, comparar paneles 1 y 3), sugiriendo que estos residuos son dispensables para la formación de inclusiones. Sin embargo, las truncaciones de muNS a las que les faltaban los residuos N-terminal hasta el 380, 420 ó 447 formaban inclusiones que eran más pequeñas en tamaño y más esféricas que las formadas por la proteína muNS completa (Figura 2A, comparar paneles 1 y 5), la proteína muNS (127-635) o muNS (140-635) (Figura 2A, comparar paneles 3 y 5). Estos resultados sugieren que los residuos entre la región de muNS 140-380 controlan la morfología de las inclusiones y el tamaño. En contraste con las truncaciones mencionadas anteriormente, que no mostraban co-localización con ubiquitina (Figura 2B, filas 1 y 3) o reorganización de vimentina, las truncaciones de muNS (84-635), muNS (112-635), muNS (208-635) y muNS (271-635) fueron reconocidas por los anticuerpos anti-ubiquitina en la mayoría de las células (Figura 2A, paneles 2 y 4; Figura 2B, fila 2), sugiriendo que estaban mal plegadas/agregadas. Finalmente, las truncaciones a las que les faltaban más de 447 residuos N-terminal no eran capaces de formar inclusiones, pero se distribuían uniformemente a lo largo de la célula (Figura 2A, panel 6). Por tanto, todos los resultados anteriores sugieren que el segmento que comprende los residuos 448-635 es la mínima región de muNS que parece necesaria y suficiente para formar inclusiones, por tanto a lo largo de la memoria se ha designado como muNS-Mi.

Al igual que la muNS completa, muNS-Mi formaba inclusiones globulares cuando se expresaba a partir de baculovirus recombinantes en células de insecto, y estas inclusiones se podían purificar fácilmente mediante el protocolo descrito en la sección de "Métodos" en los Ejemplos. El análisis de la composición de proteínas por SDS-PAGE reveló que estas inclusiones contenían fundamentalmente muNS-Mi y no proteínas celulares. Sin embargo, aunque el nivel de expresión de muNS-Mi en células de insecto era similar al de la proteína completa, la primera generó varias inclusiones con forma de balón por célula, mientras que la última formaba sólo una gran inclusión que ocupaba la mayoría del citoplasma celular (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Identificación de los dominios que forman la proteína muNS

El análisis de la secuencia deducida de muNS del Orthoreovirus aviar reveló la presencia de cuatro regiones diferentes en muNS-Mi (Touris-Otero *et al*. Virology, 319; 94-10) (Figura 3A): dos elementos "coiled-coil" (uno que comprende los residuos 448-477, designado como Coil1 o C1 y el otro que comprende los residuos 539-605, designado como Coil2 o C2); una región espaciadora de 61 residuos que une los dos "coiled-coil" predichos (designada como Intercoil o IC); y finalmente, una región de 30 residuos hacia el extremo C-terminal del segundo "coiled-coil" que comprende los residuos 605-635 (designada como C-Tail o CT).

Se examinó la función que ejercen los diferentes dominios de muNS-Mi en la formación de inclusiones, llegándose a las siguientes conclusiones: i) Coil1 puede ser sustituido por un dominio de dimerización y ii) C-tail juega un papel clave en la orientación de los contactos entre monómeros de μNS para formar oligómeros basales, controlando así la forma de las inclusiones y la eficiencia de su formación. Asimismo, los inventores han demostrado que en la zona N-terminal de la proteína existe un dominio que, aunque es prescincible para formar inclusiones, controla la forma y el tamaño de las mismas.

Por último, se conoce que la región Intercoil de muNS aviar contiene un pequeño motivo consenso común a todas las proteínas muNS homologas examinadas de diferentes reovirus (Broering *et al*., 2005. J. Virol. 79: 6194-6206). Esta secuencia contiene dos residuos universalmente conservados, His 570 y Cys 572, y se ha demostrado que mutaciones en la proteína muNS del Orthoreovirus de mamífero en uno de estos residuos eliminan completamente su capacidad de formar inclusiones (Broering *et al*., 2005. J. Virol. 79: 6194-6206). Para comprobar si esto se cumplía también para los Orthoreovirus aviares, los inventores generaron construcciones que codificaban mutaciones puntuales en posiciones equivalentes para residuos de muNS aviar (His 487 a Gln y Cys489 a Ser) y expresaron los mutantes en células transfectadas. Tal como se muestra en la Figura 3B, los mutantes H487Q y C489S se encontraban distribuidos uniformemente a lo largo del citoplasma celular, demostrando que His487 y Cys489 son necesarios para la proteína muNS aviar para formar inclusiones.

Ejemplo 3

Identificación de las regiones de la proteína muNS que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones formadas por muNS

En el presente ejemplo, tomando como punto de partida los ensayos mencionados anteriormente, los autores decidieron comprobar si diferentes dominios de muNS son capaces de incorporarse a las inclusiones citoplasmáticas formadas por la proteína entera, para comprobar cuáles de ellos están directamente implicados en la interacción entre monómeros de muNS.

Para realizar este estudio se dividió inicialmente la proteína muNS en las 5 regiones descritas en el ejemplo 2. Dichas regiones o dominios son: región N-terminal (residuos 1-448), Coil1 o C1 (residuos 448-477), Intercoil o IC (residuos 477-542), Coil2 o C2 (residuos 539-605) y C-Tail o CT (residuos 605-635) (Figura 4).

Estos dominios se expresaron fusionados al epitopo HA del virus influenza en su extremo carboxilo para poder diferenciar su expresión de la de la proteína muNS entera mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epitopo HA. El análisis por Western-blot usando anticuerpos policlonales contra muNS reveló que la mayoría de las proteínas se expresan bien y que tienen el tamaño esperado para cada uno de los mutantes (datos no mostrados). Los dominios Coil1 y C-Tail no se consiguieron expresar ni individualmente ni fusionados a HA en su extremo carboxilo ni en su extremo amino. Para poder analizar la interacción de estos dos dominios con las inclusiones de muNS, se añadieron a estos dominios otros que sí se expresaban correctamente, con el objeto de comparar si su presencia influía en el reclutamiento de los mutantes. Así se generaron los mutantes muNS(1-477)-HA, donde se añadió el Coil1 a la región N-terminal, y el muNS(539-635)-HA, donde se añadió el C-Tail al Coil2.

El análisis por inmunofluorescencia reveló que, cuando se expresaban solos, todos los mutantes de muNS se distribuían de forma difusa por todo el citoplasma y núcleo (Figura 4, fotografías de la izquierda). Además, la fusión de HA en el extremo carboxilo no parece influir en la distribución intracelular de los mutantes, ya que coincide exactamente con la distribución en su ausencia (datos no mostrados).

Cuando se realizó un análisis similar en células que coexpresan muNS se obtuvieron los siguientes resultados:

(i) El dominio Intercoil que comprende los residuos 477-542 es el que se incorpora más eficientemente a las inclusiones de muNS, ya que toda la proteína se detecta en los cuerpos de inclusión (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 3).

(ii) El dominio N-terminal (muNS(1-448)) se incorpora a las inclusiones, aunque se detectó algo de proteína por el núcleo y citoplasma (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 2). El mismo patrón de distribución presentaba la región 1-477 (Figura 4), es decir, fragmento que incluye toda la región N-terminal y el Coil1 (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 2).

De ello se deduce que el primer dominio coiled-coil no parece ser determinante en la incorporación a las inclusiones y que en esta región existe algún dominio de interacción que provoca su incorporación a las inclusiones. Consecuentemente, se expresaron fragmentos de dicha región de manera individual para tratar de localizar dicho dominio de interacción. Así se crearon los mutantes muNS(1-154)HA, muNS(1-380)HA y muNS(381-448)HA (Figura 4).

Las regiones muNS(1-380) y muNS(1-154) se incorporaron a las inclusiones pero pobremente, ya que se detectó mucha proteína por todo el núcleo y citoplasma (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 1). Sin embargo, la región muNS(381-448) se incorporó eficientemente a las inclusiones, ya que toda la proteína se detectó en los cuerpos de inclusión (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 3).

(iii) El Coil2, residuos 539 a 605, también se incorporó a las inclusiones, aunque no de forma tan eficiente como las anteriores regiones, ya que se detectó proteína tanto en la inclusión como por toda la célula y núcleo (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 4). Al añadirle el C-Tail a este Coil2, para formar el mutante muNS(539-635)-HA, no pareció influir en la incorporación a las inclusiones (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 4). Este es un resultado contradictorio con las evidencias mostradas en el Ejemplo 2, donde se concluía que este dominio C-Tail jugaba un papel clave en la orientación de los contactos entre los monómeros de μNS para formar oligómeros basales, controlando así la forma de las inclusiones y la eficiencia de su formación. Sin embargo, con la metodología empleada en este ensayo, los autores no fueron capaces de detectar su participación en la interacción directa entre monómeros.

Se puede concluir, por tanto, que las regiones que poseen un mayor grado de interacción específica con la proteína completa son los dominios Intercoil (muNS(477-542)) y muNS(381-448). Por otra parte, los dominios que demuestran un menor grado de interacción específica son Coil2, C-Tail, y la región N-terminal de muNS entre los residuos 1 a 380. Otra región menos importante desde el punto de vista de la interacción según estos resultados, es el primer coiled-coil o Coil1 (residuos 448-477), ya que su deleción no parece influir en la incorporación a las inclusiones ((muNS(1-477) se incorpora tan eficientemente como muNS(1-448) (Figura 4, fotografías de la derecha, línea 2). Asimismo, los autores concluyen que este etiquetado puede utilizarse para: i) secuestrar proteínas en las inclusiones; ii) purificar proteínas activas de forma simple; iii) detección de interacciones intracelulares proteína-proteína. Y por otro lado, mediante la

adición de diferentes señales de localización nuclear, se puede adaptar este sistema para generar inclusiones nucleares y gracias al etiquetado con los dominios mencionados, estas inclusiones pueden utilizarse para: i) secuestrar proteínas nucleares y ii) detectar la interacción de proteínas nucleares *in vivo*.

Ejemplo 4

Incorporación de GFP en las inclusiones a través de la unión de algunos dominios de muNS

A continuación se realizaron experimentos para comprobar si alguno de los dominios de muNS era capaz de arrastrar a una proteína exógena a las inclusiones formadas por la proteína entera, sin afectar a la integridad de las mismas. Para ello, se fusionó la proteína GFP al extremo amino-terminal de los diferentes dominios de muNS. El uso de la proteína fluorescente facilita la detección de las quimeras e indica si la proteína asociada a las inclusiones está correctamente plegada. El análisis por Western-blot, con anticuerpos policlonales contra muNS, reveló que las proteínas expresadas tenían el tamaño esperado para cada construcción (datos no mostrados). En el caso de GFP se generaron y detectaron quimeras con todos los dominios individuales de muNS. Así, se construyeron todos los mutantes mostrados en la Figura 5.

El análisis por microscopía de fluorescencia reveló que GFP y todas las proteínas de fusión se distribuían de forma difusa por la célula en ausencia de inclusiones de muNS (Figura 5, fotografías de la izquierda). A continuación se realizó un análisis similar en células que coexpresaban muNS. La proteína GFP sola continuaba distribuyéndose de manera difusa por toda la célula, a pesar de que se detectó una pequeña parte en las inclusiones de muNS (Figura 5, fotografías de la derecha, línea 1), lo que indicaba que GFP, aunque no quedaba excluida de las inclusiones, no se incorporaba a ellas. Se obtuvieron resultados similares con las quimeras GFP-muNS(1-154) y GFPmuNS(1-380), GFP-Coil1 (muNS(448-477)) y GFP-C-Tail (muNS(605-635)) (Figura 5, fotografías de la derecha, líneas 2 y 7). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el Ejemplo 3, en donde se demostró que estas zonas no se incorporaban de manera eficiente a las inclusiones.

La quimera que contenía la región N-terminal GFP-muNS(1-448) se incorporó de forma eficiente a los cuerpos de inclusión, aunque se detectó algo de proteína por el núcleo y citoplasma (Figura 5, fotografías de la derecha, línea 3). Al añadirle el Coil1 a dicha quimera, generando la construcción GFP-muNS(1-477) (Figura 5, fotografías de la derecha, línea 3) no cambió el patrón de incorporación, coincidiendo con los resultados mencionados anteriormente. Como se ha visto anteriormente, la quimera GFP-muNS(1-380) no se incorporó a las inclusiones, mientras que la región muNS (381-448) fusionada con GFP no se reclutó tan eficientemente a las inclusiones como era de esperar, ya que se detectó tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 5, fotografías de la derecha, línea 4). Esto podría deberse a que la GFP bloquea/oculta la zona de interacción del fragmento con muNS. Para intentar solucionarlo, se fusionó la GFP en su extremo C-terminal y esta nueva quimera tampoco se incorporaba eficientemente a las inclusiones (Figura 5, línea 4). Por tanto, se puede concluir que la presencia de la proteína GFP, independientemente de su posición (C-terminal o N-terminal) perturba la interacción entre este dominio y las inclusiones, mientras que no lo hace sobre la región N-terminal entera de muNS (1-448).

El dominio Intercoil fusionado con GFP se incorporó muy eficientemente a las inclusiones formadas por muNS, ya que toda la proteína GFP se detectó en los cuerpos de inclusión (Figura 5, línea 5).

El dominio Coil2, de 539 a 605 fusionada con GFP se reclutó a las inclusiones, aunque no de forma tan eficiente como el Intercoil, ya que se detectó proteína tanto en la inclusión como en el resto de la célula (Figura 2, línea 6).

Ejemplo 5

Identificación de las regiones de la proteína muNS que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones formadas por muNS-Mi

A continuación se realizó un estudio similar para encontrar los dominios de muNS que interaccionan con la región mínima de muNS (muNS-Mi) que es capaz de generar inclusiones citoplasmáticas. Esta región contiene los dominios Coil1, Intercoil, Coil2 y C-Tail.

Al contrario de lo que sucedía cuando se coexpresaban con la proteína entera, las construcciones que contenían la región N-terminal de muNS no se incorporaban a las inclusiones de muNS-Mi, ya que, aún en su presencia se distribuían de forma difusa por toda la célula (Figura 6, líneas 1 y 2). Por tanto, se deduce que la región amino-terminal de muNS (1-448) no interacciona con muNS-Mi y que su capacidad para interaccionar con muNS depende de la presencia de una región idéntica en la proteína formadora de inclusiones.

Sin embargo, la región que incluía todo el extremo amino y el primer coiled-coil (muNS(1-477)) sí se incorporaba a las inclusiones, aunque de forma muy poco eficiente (Figura 6, línea 3), lo que constituye la primera evidencia de que este dominio está implicado también en las interacciones monómero-monómero de muNS.

El Intercoil (muNS(477-542)) fusionado con HA no pudo ser detectado cuando se coexpresó con muNS-Mi. La única explicación que se encuentra a este resultado es que el epitopo HA quede oculto dentro de las inclusiones, y por ello el anticuerpo no pueda acceder a él y no se obtiene señal.

El dominio Coil2, es decir, la región de 539 a 605 se incorporó a las inclusiones, aunque poco eficientemente, ya que se detectaba proteína tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 6, línea 4). Al añadirle el C-Tail al Coil2 no se observaba ninguna mejora (Figura 6, línea 4), lo que nuevamente indicaba que este dominio no debe participar directamente en las interacciones proteína-proteína entre monómeros de muNS.

A continuación se pasó a comprobar si los diferentes dominios de muNS eran capaces de dirigir a la proteína GFP a las inclusiones de muNS-Mi, al fusionarlos al extremo carboxilo de la proteína fluorescente. Lo primero que se hizo como control fue co-expresar muNS-Mi con GFP y se vio que la proteína GFP continuaba distribuyéndose de manera difusa por la célula, a pesar de que una pequeña parte fue detectada en las inclusiones (Figura 7, línea 1) lo que indicaba que GFP por sí sola no se incorpora a las inclusiones. Se obtuvieron resultados similares al co-expresar la fusión GFP-C-Tail con muNS-Mi (Figura 7, paneles de la derecha, comparar líneas 1 y 6), lo que se correspondía con los resultados obtenidos en el Ejemplo 4 y confirmando que la región C terminal no parece aportar interacción directa entre los monómeros de muNS.

GFP-Coil1 (GFP-muNS(448-477)), se reclutaba a los cuerpos de inclusión más eficientemente que la GFP sola, aunque una parte de la proteína se distribuía por toda la célula (Figura 7, paneles de la derecha, comparar línea 1 con 5). Lo mismo sucedía al añadirle el Coil1 a la región N-terminal de muNS que no interaccionaba con muNS-Mi, generando la quimera GFPmuNS(1-477) (Figura 7, paneles de la derecha, comparar línea 1 con 5). Al igual que se ha mostrado en el Ejemplo 4, estos resultados demuestran que el dominio Coil1 es reclutado a las inclusiones de forma no muy eficiente.

De nuevo, la región 477-542, o Intercoil, fusionada con GFP se incorporaba muy eficientemente a los cuerpos de inclusión formados por muNS-Mi, ya que toda la fluorescencia se detectaba en las inclusiones (Figura 7, línea 3).

También el Coil2 reclutaba a GFP a las inclusiones, pero no tan eficientemente como el Intercoil, ya que se detectaba proteína tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 7, línea 4).

Los resultados demuestran que se pueden utilizar distintos dominios de la proteína muNS como etiquetas moleculares para dirigir a proteínas a las inclusiones formadas por muNS-Mi. Al igual que en el ejemplo anterior, el dominio Intercoil parece ser el más adecuado e igualmente la proteína reclutada (GFP) no pierde su actividad. Asimismo, se puede concluir que los dominios de muNS que se sitúan hacia el extremo N-terminal de la proteína, en concreto el situado entre los residuos 381-448 no interaccionan con muNS-Mi, mientras que sí lo hacen y de manera muy eficiente con la proteína completa.

Ejemplo 6

Método para purificar proteínas basado en el reclutamiento de proteínas a las inclusiones

Teniendo en cuenta que: i) las inclusiones citoplasmáticas formadas por las proteínas muNS y muNS-Mi son capaces de secuestrar proteínas activas cuando están etiquetadas con el dominio Intercoil y ii) que se demostró que los cuerpos de inclusión formados por muNS o muNS-Mi expresadas en el sistema de báculo virus/células de insecto se purifican fácilmente preservando su estructura (véase el Ejemplo 1), este sistema podría utilizarse como un método sencillo para purificar proteínas. La generación de los baculovirus recombinantes que expresaban las proteínas muNS y muNS-Mi y la caracterización de su expresión en células de insecto han sido descritos en el Ejemplo 1 y se muestran en la Figura 8.

Para comprobar el método de purificación de proteínas se construyeron dos baculovirus nuevos: uno que expresaba GFP (Bac-GFP) y otro que expresaba GFP fusionada al dominio de Intercoil, con una secuencia diana para la proteasa factor Xa separando ambos dominios proteicos (Bac-GFP-Xa-Intercoil). El uso de la proteína verde fluorescente facilitó el seguimiento del proceso de purificación y permitió comprobar fácilmente el correcto plegamiento y funcionalidad de la proteína a purificar. Al igual que en el caso de muNS y muNS-Mi, la expresión de la proteína GFP recombinante y de GFP-Xa-Intercoil en células de insecto se analizó mediante electroforesis y Western-blot a las 72 h.p.i. Como se muestra en la Figura 8A, una proteína de un tamaño de 30 kDa y otra de unos 38 kDa se detectaron en los extractos de células de insecto infectadas con los correspondientes baculovirus recombinantes (carriles 5 y 6), pero no en los extractos de células sin infectar (carril 1) o infectadas con el baculovirus salvaje (carril 2). Además, estas proteínas fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal contra GFP (Figura 8C). Tanto GFP como GFP-Xa-Intercoil mostraban una distribución difusa por toda la célula (Figura 8D, paneles inferiores).

(A) *Método para purificar proteínas basado en el reclutamiento de proteínas a las inclusiones formadas por la proteína muNS*

El protocolo que se utilizó para purificar los cuerpos de inclusión que contenían la proteína GFP etiquetada con el dominio Intercoil fue el descrito en la sección de “Métodos” de los Ejemplos de la presente memoria, que evitaba el

uso de detergentes y altas concentraciones de sal. Para comprobar el sistema de purificación se co-infectaron células de insecto sf9 con los baculovirus recombinantes que expresaban las proteínas: muNS (Bac-muNS) y GFP-Intercoil (Bac-GFP-Intercoil) (Figura 9B). Como control negativo se co-infectaron las células con los baculovirus que expresaban las proteínas muNS (Bac-muNS) y GFP (Bac-GFP) (Figura 9A). A las 72 horas post-infección las células se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 x g, tras lo cual se resuspendieron en 10 ml de tampón hipotónico (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) y se mantuvieron en hielo durante 15 minutos para facilitar su lisis. El extracto total, que se muestra en el carril 1 de la Figura 9 (A y B), fue centrifugado a 2000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante cargado en el carril 2 de la Figura 9 (A y B). El pellet resultante se lavó varias veces más (ver apartado de Métodos) y finalmente se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico y se sonicó para romper los núcleos y fragmentar el ADN. El extracto sonicado (Figura 9A y B, carril 3) se centrifugó a 200 x g obteniéndose un pellet y un sobrenadante (Figura 9A y B, carril 4). El pellet se lavó varias veces hasta obtener el extracto purificado que se muestra en el carril 5 de las Figuras 6A y 6B. En todos los casos, la identidad de las proteínas expresadas se confirmó mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra muNS (Figuras 9A y 9B, paneles intermedios) y contra GFP (Figuras 9A y 9B, paneles inferiores).

En el control negativo (Figura 9A) se observa como la mayoría de la proteína GFP sin etiquetar se libera al sobrenadante tras la lisis celular (carril 2). Las trazas de GFP que todavía quedaron en el pellet se eliminaron completamente en los lavados realizados en el proceso de purificación, lo que se puede observar en el Western-blot realizado con anticuerpos contra GFP (Figura 9A, panel inferior, comparar canales 2, 3, 4 y 5). Por el contrario, la proteína GFP etiquetada con el dominio Intercoil (Figura 9B, GFP*) quedó firmemente asociada a las inclusiones de muNS ya que la mayor parte quedó asociada con muNS en el pellet final purificado (Figura 9B, carril 5).

Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de las células por microscopía de fluorescencia (Figura 9D). Así, se observó que la proteína GFP etiquetada (panel de la derecha) se asociaba claramente con las inclusiones formadas por la proteína muNS, mientras que ésto no sucedió con la no etiquetada (panel de la izquierda).

Con objeto de purificar la proteína GFP-Intercoil, las inclusiones de muNS contenidas en el pellet final se desmantelaron por incubación con 500 mM de NaCl. La muestra resuspendida en sal se centrifugó 5 minutos a 16.000 x g, para eliminar los restos insolubles y el sobrenadante (Figura 9B, carril 6) se pasó a través de una columna de desalado para permitir la reasociación de los monómeros de muNS y la consecuente liberación de GFP-Intercoil. El eluído se centrifugó 5 minutos a 16.000 x g, para eliminar restos insolubles, manteniéndolo con el sobrenadante (Figura 9B carril 7) que apenas contenía proteína muNS (Figura 9B comparar carril 7 con carril 6), y que contenía la proteína GFP-Intercoil y algunas bandas secundarias que se correspondían con fragmentos de la degradación del Intercoil, ya que se detectaron con el anticuerpo monoclonal contra GFP (Figura 9B carril 7, paneles inferiores). El extracto sin sal se incubó posteriormente con el Factor Xa para liberar GFP de su unión al Intercoil (Figura 9B carril 8, panel superior), lo que se confirmó mediante Western-blot, (Figura 9B carril 8, panel inferior). Con el fin de completar la purificación y eliminar los restos de muNS, Intercoil y proteasa, el extracto mostrado en el carril 8 de la Figura 9B se pasó por una columna de Q-Sepharosa preequilibrada con 20 mM Tris-HCl pH 8. La columna se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl y las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE, detectándose la GFP en la elución de 400 mM de NaCl (datos no mostrados). Finalmente, las fracciones que contenían GFP se concentraron y la muestra se analizó por SDS-PAGE, observándose una única banda de unos 30 kDa (Figura 9B, panel de la izquierda), que mediante Western-blot se comprobó que se trataba de GFP (Figura 9B, panel de la derecha).

(B) *Método para purificar proteínas basado en el reclutamiento de proteínas a las inclusiones formadas por la proteína muNS-Mi*

Como se había demostrado anteriormente, el dominio Intercoil también es capaz de dirigir proteínas a las inclusiones formadas por muNS-Mi. Por ello, los inventores se decidieron a probar el sistema de purificación de proteínas con estas inclusiones que son más pequeñas y compactas que las que forman la proteína muNS entera. De esta manera, se podría disponer de un sistema alternativo para acomodar a hipotéticas proteínas que se pudieran purificar con las inclusiones de muNS, o cuyo tamaño sea parecido al de muNS. Para analizar este sistema de purificación, se llevó a cabo exactamente el mismo método que con la proteína entera y los resultados se muestran en la Figura 10, cuya distribución es exactamente igual a la Figura 9 con el objeto de facilitar su análisis. En este caso, también se utilizó la proteína GFP sin etiquetar como control negativo (Figura 10A) y se purificó la quimera GFP-Intercoil (Figura 10B). Los resultados obtenidos fueros idénticos a los ya descritos para la proteína muNS entera. Así, la proteína GFP sin etiquetar no se asociaba con las inclusiones, mientras que la etiquetada con Intercoil se purificaba fácilmente. Del mismo modo, las inclusiones purificadas se desmantelaban con sal y la proteína etiquetada se recuperaba fácilmente en condiciones nativas. Estos resultados demuestran que ambos tipos de inclusiones constituyen la base de un sistema de purificación de proteínas sencillo y eficiente.

Ejemplo 7

Método para detectar la interacción entre proteínas en el citoplasma de células eucariotas

El poder dirigir proteínas de interés a las inclusiones formadas por muNS y muNS-Mi tiene múltiples aplicaciones potenciales además de la purificación de proteínas. Una de estas aplicaciones es identificar interacciones entre proteínas en el interior de células eucariotas. Así, si se etiqueta con el dominio Intercoil a una proteína de interés para

dirigirla a los cuerpos de inclusión, ésta podrá atraer otras proteínas que interaccionen fuertemente con ella y relocalizarlas a las inclusiones en ausencia de etiqueta. Para comprobar la eficacia de dicho método se utilizó el sistema p53-antígeno T de SV40. Estas dos proteínas interaccionan fuertemente entre sí en el interior de la célula y dicha interacción está muy bien caracterizada (Ali *et al*., 2001, Semin. Cáncer Biol. 11, 15-23). De hecho, esta pareja constituye el control positivo de otros métodos muy conocidos para detectar interacciones entre proteínas como el "Two-Hybrid" o sistema de doble híbrido (Clontech). De este modo se etiquetó la proteína p53 con el dominio Intercoil y se pudo comprobar: i) si la proteína p53 etiquetada con Intercoil es reclutada eficientemente a las inclusiones de muNS y ii) si es capaz de atraer a las inclusiones a su ligando habitual, el antígeno T de SV40 (ver Figura 11).

(A) *Reclutamiento de p53-Intercoil por la proteína muNS y su versión fusionada con GFP*

El primer paso para el desarrollo del sistema fue construir un plásmido que expresase la proteína p53 humana fusionada en su extremo carboxilo al dominio Intercoil, obteniéndose p53-Intercoil. La identidad de dicha construcción se confirmó mediante la secuenciación de su plásmido de expresión y mediante análisis por Western-blot de los lisados de células CEF transfectadas con este plásmido, usando anticuerpos contra muNS y p53 (datos no mostrados).

Para determinar la distribución intracelular de p53-Intercoil, se transfectaron células CEF con el plásmido p53-Intercoil, se fijaron a las 24 h y se analizaron por inmunofluorescencia usando anticuerpos contra p53. La proteína de fusión p53-Intercoil se localizaba principalmente en el núcleo, que es la localización habitual de p53 (Figura 12A). Este resultado demuestra que la fusión del dominio de Intercoil al extremo carboxilo de p53 no modifica su localización intracelular. A continuación, se co-expresaron las proteínas p53 y muNS, y se analizó su distribución intracelular mediante inmunofluorescencia. La proteína p53 se localizaba principalmente en el núcleo y no en las inclusiones citoplasmáticas formadas por muNS (Figura 12B, paneles superiores). Este resultado demuestra: i) que p53 no se asocia con los cuerpos de inclusión y; ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a las inclusiones. Sin embargo, en las células que co-expresaban p53-Intercoil y muNS, p53 se localizaba mayoritariamente en las inclusiones, aunque en muchas células una pequeña parte de p53 permanecía en el núcleo (Figura 12B, paneles inferiores).

Posteriormente se repitió el experimento utilizando GFP-muNS en vez de muNS, ya que tiene la ventaja de que no se requieren anticuerpos para detectar las inclusiones y por un trabajo anterior se sabe que la fusión de la proteína GFP no afectaba a la formación de inclusiones por parte de muNS. Como en el caso anterior, p53 permanecía en el núcleo cuando se co-expresaba con GFP-muNS, lo que demuestra: i) que p53 no se asocia con las inclusiones de GFP-muNS y; ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a las inclusiones formadas por GFP-muNS (Figura 12C, paneles superiores). Sin embargo, en las células que co-expresan p53-Intercoil y GFP-muNS, la p53 se localizaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 12C, paneles inferiores), demostrando al igual que en el caso anterior, que la incorporación de p53 a las inclusiones formadas por GFP-muNS no afectaba a la integridad de las mismas.

(B) *Unión del antígeno T de SV40 endógeno a p53-Intercoil unido a las inclusiones*

A continuación se procedió a comprobar si el etiquetado de p53 con el dominio Intercoil y consecuentemente, su relocalización a las inclusiones de muNS, provocaba también la relocalización de ligandos conocidos de la proteína p53. Para ello, se utilizaron células COS-7, que tienen integrada una copia del genoma del SV40 y por lo tanto expresan el antígeno T (Ag.T) de SV40 (Gluzman, 1981, Cell, 23: 175-82), que se localiza mayoritariamente en el núcleo (Kalderon *et al*., 1985, Cell 39: 499-509).

La proteína p53 se localizaba exclusivamente en el núcleo de las células COS-7 cuando se co-expresaba con muNS (Figura 13 A, paneles superiores) o con GFP-muNS (Figura 13B, paneles superiores). Sin embargo, p53-Intercoil se localizaba mayoritariamente en las inclusiones formadas por muNS o GFP-muNS (Figura 13A y 13B, paneles inferiores), lo que demuestra que el sistema para reclutar proteínas a inclusiones de muNS funciona perfectamente en diferentes tipos celulares.

A continuación, se comprobó que en las células COS-7 donde se expresaba p53 y muNS o GFP-muNS, el antígeno T se encontraba exclusivamente en el núcleo, que es su localización habitual (Figura 14B y 14C, paneles superiores). Estos resultados demuestran: i) que el antígeno T no se asocia con las inclusiones y ii) que el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones. Sin embargo, en células COS-7 que expresaban p53-Intercoil en presencia de muNS o GFP-muNS, el antígeno T pasó a detectarse mayoritariamente en las inclusiones, a pesar de que una pequeña parte permaneció en el núcleo (Figura 14B y C, paneles inferiores). Este resultado demuestra: i) que el antígeno T es reclutado a las inclusiones por asociación con p53; ii) la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión por asociación con p53 no afecta a la integridad de los mismos; y iii) el sistema de etiquetado con el dominio Intercoil se puede utilizar como una plataforma para ver si dos proteínas interaccionan entre sí en el citoplasma de células eucariotas, incluso cuando las proteínas problema son proteínas nucleares.

Finalmente, como control para demostrar que el anticuerpo contra el antígeno T no reconoce a p53, se expresó la construcción p53-Intercoil y se detectó usando anticuerpos contra muNS y antígeno T. La expresión de la construcción p53-Intercoil se detectó con anticuerpos anti-muNS debido a la presencia del dominio Intercoil, pero el anticuerpo contra el antígeno T no generó ninguna señal por encima del fondo celular, por lo que se puede concluir que el anticuerpo contra el antígeno T no reconoce a p53 (Figura 14A).

(C) *Unión del antígeno T de SV40 exógeno a p53-Intercoil unido a las inclusiones*

Una vez demostrado que p53 es capaz de atraer a las inclusiones al antígeno T expresado endógenamente por las células COS-7, se procedió a investigar si el sistema también funcionaba con el antígeno T (Ag.T) exógeno expresado mediante transfección de células CEF, ya que estas células no expresan Ag.T. Ésto tiene la dificultad teórica añadida de que tres plásmidos distintos deben entrar en la misma célula. Sin embargo, se sabe que al realizar co-transfecciones con múltiples plásmidos, las células transfectadas suelen incorporar todos los plásmidos usados o ninguno. Actualmente existen numerosos ejemplos de técnicas que se basan en la co-transfección de múltiples plásmidos, como el sistema de híbrido doble para células de mamífero (Clontech), o los sistemas de genética reversa desarrollados para reovirus, orbivirus, etc (Boyce *et al*., 2008, J. Virol. 82: 8339-48).

Como en el caso anterior de células COS-7, el antígeno T expresado a partir de plásmidos se localizaba exclusivamente en el núcleo de células CEF en donde se co-expresaba junto con muNS y p53 o con GFP-muNS y p53 (Figura 15B y C, paneles superiores). Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasaba a localizarse mayoritariamente en las inclusiones (Figura 15B y C, paneles inferiores), lo que vuelve a demostrar la validez de este sistema para estudiar interacciones entre proteínas que pueden ser expresadas endógenamente por las células utilizadas o mediante el uso de plásmidos recombinantes.

Nuevamente, como control para demostrar que el anticuerpo contra el antígeno T no reconoce a p53, se expresó la construcción p53-Intercoil y se detectó usando anticuerpos contra muNS y antígeno T. p53-Intercoil reaccionó con anti-muNS pero no con el anticuerpo contra el antígeno T, como era de esperar (Figura 15A).

(D) *Unión del antígeno T de SV40 endógeno a p53-Intercoil unido a las inclusiones formadas por muNS-Mi*

A continuación se procedió a comprobar si el sistema de detección de interacciones entre proteínas funcionaba también al sustituir muNS y GFP-muNS por muNS-Mi y GFP-muNS-Mi, para poder disponer de un sistema alternativo. Para ello la metodología a seguir fue la misma que se empleó para el caso de la muNS/GFP-muNS, es decir, se estudió la interacción de p53 con el Antígeno T, tanto en células COS-7 como en células CEF.

En cuanto al antígeno endógeno, como en el caso de muNS, p53 se detectaba exclusivamente en el núcleo de las células COS-7 y no en las inclusiones formadas por muNS-Mi en las células que co-expresaban muNS-Mi y p53 (Figura 16A, paneles superiores); demostrando que: i) que p53 no se asocia a los cuerpos de inclusión formados por muNS-Mi y ii) que el anticuerpo contra p53 no reconoce a las inclusiones formadas por muNS-Mi. Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, p53 se localizaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 16A, paneles inferiores), demostrando que su incorporación a los cuerpos de inclusión no afectaba a la integridad de los mismos. Hay que destacar que en este caso se observó la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas, lo cual puede deberse a que la p53-Intercoil arrastre a la muNS-Mi al núcleo, debido a su pequeño tamaño y a la presencia de señales de localización nuclear en p53. A continuación, se repitió el proceso utilizando GFP-muNS-Mi, evitando así el uso de anticuerpos contra muNS. Como en el caso anterior, p53 se mantenía en el núcleo cuando se co-expresaba con GFP-muNS-Mi, lo que demostraba: i) que p53 no se asocia con las inclusiones y ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a los cuerpos de inclusión formados por GFP-muNS-Mi (Figura 16B, paneles superiores). Al sustituir p53 por p53-Intercoil, p53 se localizaba casi exclusivamente en las inclusiones (Figura 16B, paneles inferiores), demostrando que la incorporación de p53 a las inclusiones formadas por GFP-muNS-Mi no afectaba a la formación/integridad de las mismas.

A continuación se analizó la distribución del Ag.T en células COS-7 donde se expresó p53-Intercoil junto con muNS-Mi o GFP-muNS-Mi. Expresando p53 en presencia de muNS-Mi o GFP-muNS-Mi, el antígeno T se localizaba exclusivamente en el núcleo (Figura 17A y B paneles superiores); demostrando: i) que el antígeno T no se asocia con las inclusiones que forma muNS-Mi y; ii) que el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones de muNS-Mi. No obstante, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasaba a localizarse mayoritariamente en las inclusiones (Figura 17A y B paneles inferiores). Al igual que en el caso anterior, se observaron algunas inclusiones nucleares al utilizar muNS-Mi. Estos resultados demuestran: i) que la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión de muNS-Mi por asociación con p53 no afecta a la integridad/formación de los mismos; y ii) que las inclusiones formadas por muNS-Mi o GFP-muNS-Mi pueden utilizarse como plataforma para ver si dos proteínas interaccionan entre sí en el citoplasma.

(E) *Unión del antígeno T de SV40 exógeno a p53-Intercoil unido a las inclusiones formadas por muNS-Mi*

Al igual que se hizo con muNS, se pasó a estudiar la interacción entre p53 y el antígeno T exógeno expresado a partir de plásmidos utilizando muNS-Mi como plataforma. Para ello, se transfectaron células CEF con cada una de las construcciones y se analizó su distribución mediante inmunofluorescencia como se hizo anteriormente. De nuevo, p53 se localizaba exclusivamente en el núcleo de las células que co-expresaban muNS-Mi o GFP-muNS-Mi y no en las inclusiones, quedando incluso excluidas de las mismas (Figura 18A y B paneles superiores). Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, ésta se detectaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 18A y B paneles inferiores). Como en el caso de las células COS-7 se observó la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas. Además, el antígeno T se localizó exclusivamente en el núcleo de las células, en donde se co-expresaba con p53 y muNS-Mi o GFP-muNS-Mi (Figura 18A y B, paneles superiores). Sin embargo, sustituyendo p53 por p53-Intercoil, el antígeno T se localizaba mayoritariamente en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos y nucleares (Figura 18A y B, paneles inferiores).

Ejemplo 8

Inclusiones nucleares de muNS

La aparición de pequeñas inclusiones en el núcleo al utilizar el sistema con muNS-Mi y dos proteínas nucleares (p53 y Ag. T) hacía pensar que se podría adaptar el sistema de secuestro y de detección de interacciones entre proteínas al núcleo celular, y de esta manera se podría utilizar el método para proteínas nucleares. El primer objetivo fue intentar obtener inclusiones formadas por la proteína muNS en el núcleo. Para ello se siguieron dos estrategias diferentes: i) se fusionaron a muNS secuencias de localización nuclear (NLS) cortas (la NLS del antígeno T (PKKKRKV) (Kalderon *et al*., citado *ad supra*) y la NLS de la proteína pl7 del reovirus aviar (IAAKRGRQLD) (Costas-Iglesias *et al*., 2005, J. Virol. 79: 2141-50)) y ii) se generó una fusión entre muNS y el dominio de activación usado en el sistema del híbrido doble de células de mamífero (Mammalian Matchmaker, Clontech) que contiene la NLS del Ag.T fusionada a la proteína VP16 del Herpesvirus, por sí las NLS cortas no se dispusieran correctamente en el entorno de la proteína para permitir su captura por los transportadores celulares. La identidad de cada construcción se comprobó mediante secuenciación y Western-blot. Para determinar la distribución intracelular de cada una de las construcciones, se transfectaron células CEF con cada uno de los plásmidos que los expresa, y a las 24 h.p.t se fijaron y se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales contra muNS.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: i) la proteína de fusión VP16-muNS dio lugar a la formación de inclusiones nucleares en la mayoría de las células (Figura 20A, paneles superiores); ii) la muNS con la NLS del antígeno T (NLS-Ag.T-muNS) en su extremo amino dio lugar a inclusiones nucleares en la mayoría de las células, aunque en algunas células se detectaron también algunas inclusiones en el citoplasma (Figura 20A, paneles inferiores); iii) la inclusión de la NLS de pl7 no produjo inclusiones nucleares (datos no mostrados). En vista de estos resultados, se intentó desarrollar el sistema con las construcciones VP16-muNS y NLS-AgT-muNS.

También se intentó dirigir muNS-Mi al núcleo para formar allí cuerpos de inclusión. Sin embargo, al contrario que con muNS, la construcción VP16-muNS-Mi no dio lugar a inclusiones nucleares, sino que se distribuía de forma difusa por todo el núcleo (resultados no mostrados). Además la introducción de las diferentes NLS (la del antígeno T y la de pl7 de reovirus aviar) en el extremo amino de muNS-Mi tampoco originó cuerpos de inclusión nucleares (datos no mostrados). Estos resultados negativos quizá puedan deberse a que la proximidad entre la NLS añadida (carácter fuertemente básico) y el primer coiled-coil (altamente hidrofóbico) afecte al correcto plegamiento de muNS-Mi.

Como se ha mencionado antes, la fusión de GFP al extremo amino de muNS como y muNS-Mi no afectaba a su capacidad de formar inclusiones, y tenía la ventaja de que no se requieren anticuerpos para detectar su distribución intracelular. Teniendo en cuenta ésto, se decidió generar inclusiones fluorescentes nucleares siguiendo las siguientes estrategias: i) fusionando VP16 a GFP-muNS y GFP-muNS-Mi; y ii) introducir la NLS del antígeno T en el extremo amino de las quimeras GFP-muNS y GFP-muNS-Mi. Las diferentes proteínas de fusión, es decir, VP16-GFP-muNS, NLS-Ag.T-GFP-muNS y NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi originaron cuerpos de inclusión nucleares en la mayoría de las células (Figura 20B, paneles inferiores). En el caso de VP16-GFP-muNS-Mi no originó inclusiones nucleares (datos no mostrados).

Incorporación de GFP-Intercoil en las inclusiones nucleares

El siguiente paso fue comprobar si las inclusiones nucleares obtenidas eran capaces de reclutar a GFP-Intercoil sin afectar a la integridad de las mismas. Para ello, se co-transfectaron células CEF con cada una de las construcciones formadoras de inclusiones nucleares junto con GFP-Intercoil o GFP sin etiquetar que se usaron como controles. Las células se fijaron a las 24 h.p.t, y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia para detectar su distribución intracelular. La proteína GFP se distribuyó de manera difusa por toda la célula al expresarla junto con cualquiera de las quimeras formadoras de inclusiones nucleares (Figura 21B, tercera línea y 22B, paneles superiores). Sin embargo, GFP-Intercoil se localizó casi exclusivamente en las inclusiones formadas tanto por VP16-muNS (Figura 21B, paneles inferiores), como por NLS-Ag.T-muNS (Figura 22B, paneles inferiores). Estos resultados demuestran que las inclusiones nucleares descritas en esta memoria son capaces de capturar proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil sin alterar la integridad de las inclusiones ni la actividad de la proteína incorporada.

Ejemplo 9

Unión del antígeno T de SV40 endógeno y exógeno a p53-Intercoil unido a las inclusiones nucleares

El objetivo era demostrar que este sistema puede ser utilizado para detectar la interacción de proteínas en el núcleo celular. Al igual que en los casos anteriores, el sistema se analizó con el ejemplo p53-Ag.T, tanto en células COS-7 (donde el Ag.T se expresa endógenamente) como en células CEF (donde se expresa exógenamente).

(A) *Ag.T endógeno, células COS7*

En el caso de las células COS-7, se observó que p53 se distribuía de forma difusa en el núcleo sin co-localizar con las inclusiones nucleares en las células que expresaban cualquiera de las diferentes construcciones con capacidad para formar dichas inclusiones (VP16-muNS, VP16-GFP-muNS, NLS-Ag.T-muNS, NLS-Ag.T-GFP-muNS o NLS-Ag.T-

GFP-muNS-Mi) (Figura 23A y B; Figura 27A y B y Figura 29A, paneles superiores); demostrando que: i) p53 no se asocia a las inclusiones nucleares; y ii) el anticuerpo contra p53 no reconoce a las inclusiones nucleares. Sin embargo, al usar p53-Intercoil, ésta se localizaba casi exclusivamente en las inclusiones en la mayoría de las células (Figura 23A y B; Figura 27A y B y Figura 29A, paneles inferiores) por lo que la incorporación de p53-Intercoil no afectaba a la integridad de las inclusiones.

La interacción entre p53 y el antígeno T se analizó detectando el antígeno T en lugar de p53 en un experimento similar. De esta manera se encontró que, en las células que expresaban p53 y las diferentes versiones con capacidad para formar inclusiones nucleares (VP16-muNS o VP16-GFP-muNS o NLS-Ag.T-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS o NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi), el antígeno T se localizaba exclusivamente en el núcleo sin coincidir con los cuerpos de inclusión (Figura 24A y B; Figura 28A y B y Figura 29B, paneles superiores); demostrando: i) que el antígeno T no se asocia con los cuerpos de inclusión nucleares; y ii) que el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones nucleares. En cambio, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T se localizaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 24A y B; Figura 28 A y B y Figura 29B, paneles inferiores). Estos resultados demuestran: i) que la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión nucleares por asociación con p53 no afecta a la integridad de los mismos; y ii) los sistemas aquí descritos pueden utilizarse como plataformas para ver si dos proteínas interaccionan entre sí en el núcleo de células eucariotas.

(B) *Ag.T exógeno, células CEF*

Al estudiar la interacción de p53 y el antígeno T en células CEF expresando el antígeno T por transfección de las células con plásmidos de expresión, se obtuvieron los mismos datos que en el caso del antígeno T endógeno, lo que puede observarse en las Figuras 25, 26, 30, 31 y 32.

Ejemplo 10

La proteína muNS y muNS-Mi reclutan eficientemente a p53-Intercoil y GFP-Intercoil

Se eligieron las proteínas GFP y p53 para comprobar si se podían dirigir dos proteínas a las inclusiones, ya que como se ha visto anteriormente cuando estaban fusionadas con el Intercoil se incorporaban eficientemente a las inclusiones. Se co-transfectaron células CEF con cada una de las construcciones formadoras de inclusiones junto con: i) GFP-Intercoil y p53-Intercoil; ii) GFP y p53-Intercoil que sirvió como control, para determinar que GFP sin Intercoil no se incorporaba a las inclusiones por asociación con p53; y iii) GFP-Intercoil y p53 sin etiquetar que también se usó como control, para demostrar que p53 sin Intercoil no se incorporaba a las inclusiones por asociación con GFP. Las células se fijaron a la 24 h.p.t, y se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal contra p53. Las proteínas GFP-Intercoil y p53-Intercoil se localizaban exclusivamente en las inclusiones formadas tanto por muNS (Figura 33A, paneles inferiores), como por muNS-Mi (Figura 33B, paneles inferiores). Además, en las células que co-expresaban muNS o muNS-Mi junto con GFP-Intercoil y p53, la GFP-Intercoil se localizaba en las inclusiones mientras que p53 permanecía en el núcleo (Figura 33A y 33B, paneles superiores), y en las que co-expresaban muNS o muNS-Mi junto con GFP y p53-Intercoil, la p53-Intercoil se localizaba en los cuerpos de inclusión mientras que GFP se distribuía por toda la célula sin incorporarse eficientemente a las inclusiones (Figura 33A y 33B, paneles centrales), demostrándose que p53 y GFP se incorporan a las inclusiones cuando están etiquetadas con el Intercoil y no por asociación entre ambas. Estos resultados demuestran que las inclusiones formadas por muNS o muNS-Mi son capaces de capturar varias proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil sin alterar la integridad de las inclusiones ni a la actividad de la proteína incorporada, ya que GFP continua emitiendo su fluorescencia característica, lo que podría ser utilizado para: i) favorecer el ensamblaje de complejos supramoleculares en células para su estudio estructural, como se ha comentado antes y ii) usar estas inclusiones para generar vacunas polivalentes al exponer múltiples epitopos en un mismo material particulado.

Ejemplo 11

La proteína muNS y muNS-Mi reclutan eficientemente a Halotag-Intercoil sin que éste pierda su actividad enzimática

Los resultados expuestos en otros ejemplos demuestran que la proteína GFP etiquetada con el Intercoil se incorpora eficientemente a las inclusiones formadas por muNS Y muNS-Mi. Además también se comprobó que la proteína reclutada (GFP) está perfectamente plegada y es funcional, ya que sigue emitiendo su fluorescencia característica. Para poner otro ejemplo de proteína que mantiene su actividad al incorporarse a las inclusiones de muNS y muNS-Mi, se usó la proteína HaloTag. Dicha proteína es una versión genéticamente modificada de una hidrolasa, que cataliza su unión covalente a una batería de ligandos (Cumarina, Verde Oregon, Alexa fluor 448, Ligando TMR y Ligando diAcFAM), los cuales atraviesan fácilmente las membranas celulares y pueden ser usados para marcar a proteínas fusionadas con el HaloTag localizadas en diferentes compartimentos celulares. Para demostrar que el HaloTag se incorpora a las inclusiones y una vez allí mantiene su actividad, el primer paso fue construir un plásmido que expresase la proteína HaloTag fusionada en su extremo carboxilo al dominio Intercoil, obteniéndose la HaloTag-Intercoil. La identidad de dicha construcción se confirmó mediante la secuenciación de su plásmido de expresión y mediante análisis por Western-blot de los lisados de células CEF transfectadas con este plásmido, usando anticuerpos contra muNS (datos no mostrados). Para determinar la distribución intracelular de HaloTag-Intercoil, se transfectaron células CEF con el

plásmido HaloTag-Intercoil, y a las 24 h post-transfección las células se marcaron con el ligando TMR siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madrid, España), se fijaron y se analizaron con un microscopio de fluorescencia. La proteína de fusión HaloTag-Intercoil se distribuía de forma difusa por toda la célula, al igual que la HaloTag sin etiquetar, demostrándose que la fusión del dominio de Intercoil al extremo carboxilo HaloTag no modifica su localización intracelular (Figura 34, ver paneles superiores). A continuación, se co-expresaron las proteínas HaloTag y muNS, y se analizó su distribución intracelular mediante fluorescencia tras marcar previamente con el ligando TMR. La proteína HaloTag sólo continuaba distribuyéndose de manera difusa por toda la célula, a pesar de que se detectó una pequeña parte en las inclusiones de muNS (Figura 34, paneles centrales), lo que indica que la HaloTag, aunque no queda excluida de las inclusiones, no se incorpora a ellas. Sin embargo, en las células que co-expresan Halotag-Intercoil y muNS, el Halotag se localiza mayoritariamente en las inclusiones (Figura 34, paneles centrales). Lo que demuestra que: i) el HaloTag se incorpora a las inclusiones cundo está fusionada al Intercoil, y ii) el HaloTag-Intercoil incorporado a las inclusiones está perfectamente plegado y es funcional, ya que es capaz de catalizar su unión covalente a su ligando TMR. Los mismos resultados se repitieron al co-expresar μNS-Mi con HaloTag o HaloTag-Intercoil, lo que puede observarse en los paneles de abajo en la Figura 34.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende los aminoácidos 381 a 635 de la proteína muNS de un orthoreovirus aviar o una variante funcionalmente equivalente de dicha región y que presenta la capacidad de formar inclusiones cuando se expresa en una célula, en donde dicho polipéptido no es la proteína muNS del orthoreovirus aviar.

2. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.

3. Una célula que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2 o el polipéptido según la reivindicación 1.

4. Una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

en donde el segundo componente no contiene un polipéptido que comprende los aminoácidos de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero correspondientes a la secuencia 605-635 (SEQ ID NO: 6) de dicha proteína aviar.

5. Polipéptido o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 que comprende además al menos un componente seleccionado del grupo de un péptido para facilitar su purificación y un péptido de señalización nuclear.

6. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión según la reivindicación 4.

7. Una célula que incluye la proteína de fusión según la reivindicación 4 o el polinucleótido según la reivindicación 6.

8. Un kit que comprende:

(i) un primer componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica la proteína muNS de un Orthoreovirus o una variante funcionalmente equivalente;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos 381-635 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(c) una célula que expresa la proteína muNS de un Orthoreovirus o un polipéptido que comprende los aminoácidos 381-635 de dicha proteína o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína

muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

(d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

9. Kit según la reivindicación 8 que comprende una célula adecuada para poner en práctica el kit.

10. Uso de una proteína de fusión según la reivindicación 4 para la preparación de un medicamento para la estimulación de la respuesta inmune de un sujeto.

11. Uso de una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

para incorporar el primer componente a las inclusiones resultantes de la expresión en una célula del polipéptido que comprende los aminoácidos 381 a 635 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero (SEQ ID NO: 55) o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

12. Uso según la reivindicación 11 en donde si el segundo componente de la proteína de fusión comprende los aminoácidos 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero (SEQ ID NO: 55), entonces las inclusiones son las resultantes de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

13. Método de purificación de las inclusiones formadas por un polipéptido seleccionado del grupo: polipéptido que comprende los aminoácidos 381-635 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55), la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero y una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores que comprende:

(a) expresar en una célula dicho polipéptido y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones; y

(b) purificar dichas las inclusiones.

14. Método de purificación de un polipéptido que comprende una proteína de interés que comprende:

(a) expresar en una célula el polipéptido que comprende los aminoácidos 381- 635 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero, o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene al menos un polipéptido de interés; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

en condiciones adecuadas para que se produzca interacción entre las inclusiones generadas en la etapa (a) y el segundo componente de la proteína de fusión; y en donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en cualquier orden,

(c) purificar el complejo formado entre las inclusiones y la proteína de fusión; y

(d) separar la proteína de fusión de las inclusiones.

15. Método según la reivindicación 14, en donde si el segundo componente de la proteína de fusión comprende los aminoácidos 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o los correspondientes del Orthoreovirus de mamífero (SEQ ID NO: 55), entonces las inclusiones expresadas en la etapa (a) son las resultantes de la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar o de mamífero o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores.

16. Método para la detección de la interacción entre un primer polipéptido y un segundo polipéptido que comprende:

(a) expresar en una célula el polipéptido seleccionado del grupo: polipéptido que comprende los aminoácidos 381-635 de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar, los aminoácidos correspondientes de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55), la proteína muNS completa del Orthoreovirus aviar, de mamífero y una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores y mantener dicha célula en condiciones adecuadas para la formación de inclusiones;

(b) expresar en dicha célula una proteína de fusión que comprende:

(i) un primer componente que contiene el primer polipéptido; y

(ii) un segundo componente seleccionado del grupo de:

- un polipéptido que comprende la secuencia 381-448 (SEQ ID NO: 2) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 448-477 (SEQ ID NO: 3) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores;

- un polipéptido que comprende la secuencia 477-542 (SEQ ID NO: 4) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores; y

- un polipéptido que comprende la secuencia 539-605 (SEQ ID NO: 5) de la proteína muNS del Orthoreovirus aviar o la secuencia correspondiente de la proteína muNS del Orthoreovirus mamífero (SEQ ID NO: 55) o una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de las anteriores,

en condiciones adecuadas para que la proteína de fusión se dirija a las inclusiones expresadas en la etapa (a);

(c) expresar en dicha célula el segundo polipéptido o bien mantener dicha célula en condiciones adecuadas para que se exprese dicho segundo polipéptido y

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

en donde las etapas (a), (b) y (c) se llevan a cabo en cualquier orden.

17. Método según la reivindicación 16 en donde el polipéptido que se expresa en la célula de la etapa (a) comprende un péptido para facilitar su purificación o un péptido de señalización nuclear.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, en donde la proteína de fusión incluida en la célula de la etapa (b) y/o el segundo polipéptido incluido en la célula de la etapa (c) comprenden un péptido para facilitar su purificación o un péptido de señalización nuclear.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, en donde la etapa (d) se lleva a cabo mediante la determinación de la aparición del segundo polipéptido en inclusiones nucleares.

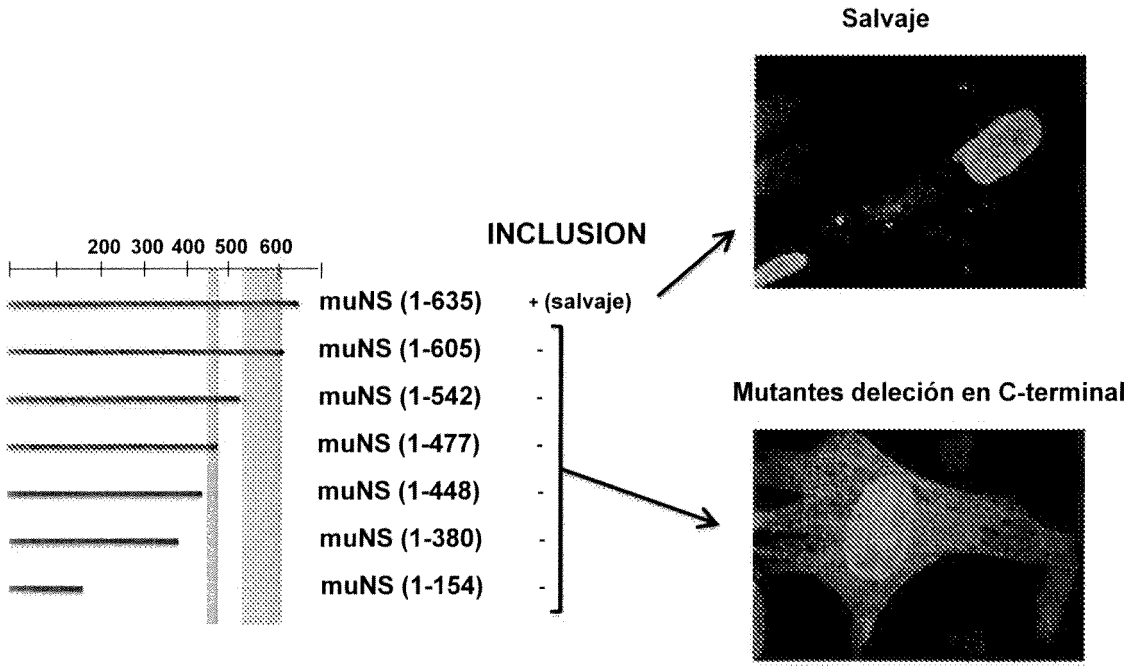
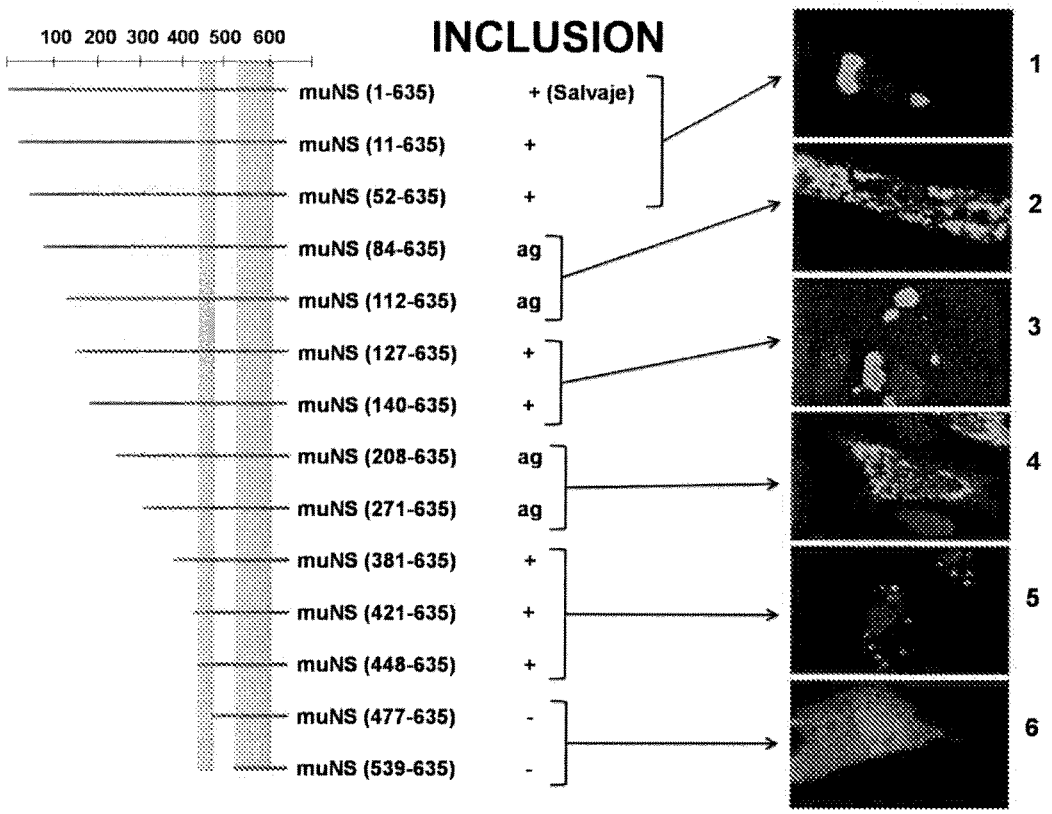

Salvaje
INCLUSION
200 300 400 500 600
muNS (1-635)
+ (salvaje)
muNS (1-605)
-
muNS (1-542)
-
muNS (1-477)
-
muNS (1-448)
-
muNS (1-380)
-
muNS (1-154)
-
Mutantes deleción en C-terminal

FIG. 1

(a)


100 200 300 400 500 600
INCLUSION
muNS (1-635)
+ (Salvaje)
muNS (11-635)
+
muNS (52-635)
+
muNS (84-635)
ag
muNS (112-635)
ag
muNS (127-635)
+
muNS (140-635)
+
muNS (208-635)
ag
muNS (271-635)
ag
muNS (381-635)
+
muNS (421-635)
+
muNS (448-635)
+
muNS (477-635)
-
muNS (539-635)
-
1
2
3
4
5
6

(b)

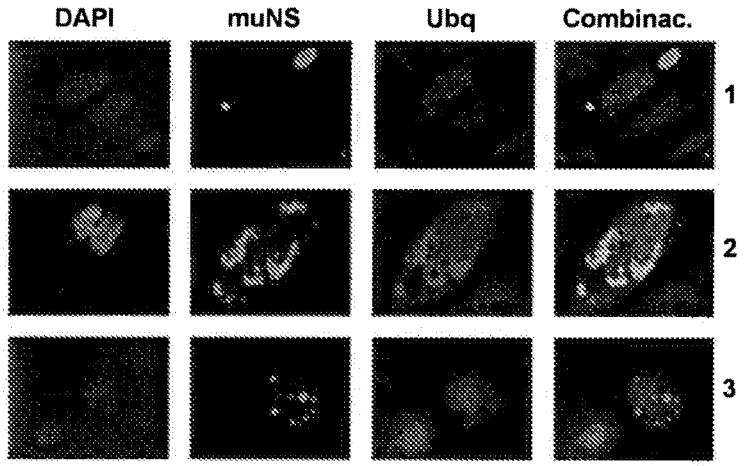

DAPI
muNS
Ubq
Combinac.
1
2
3

FIG. 2

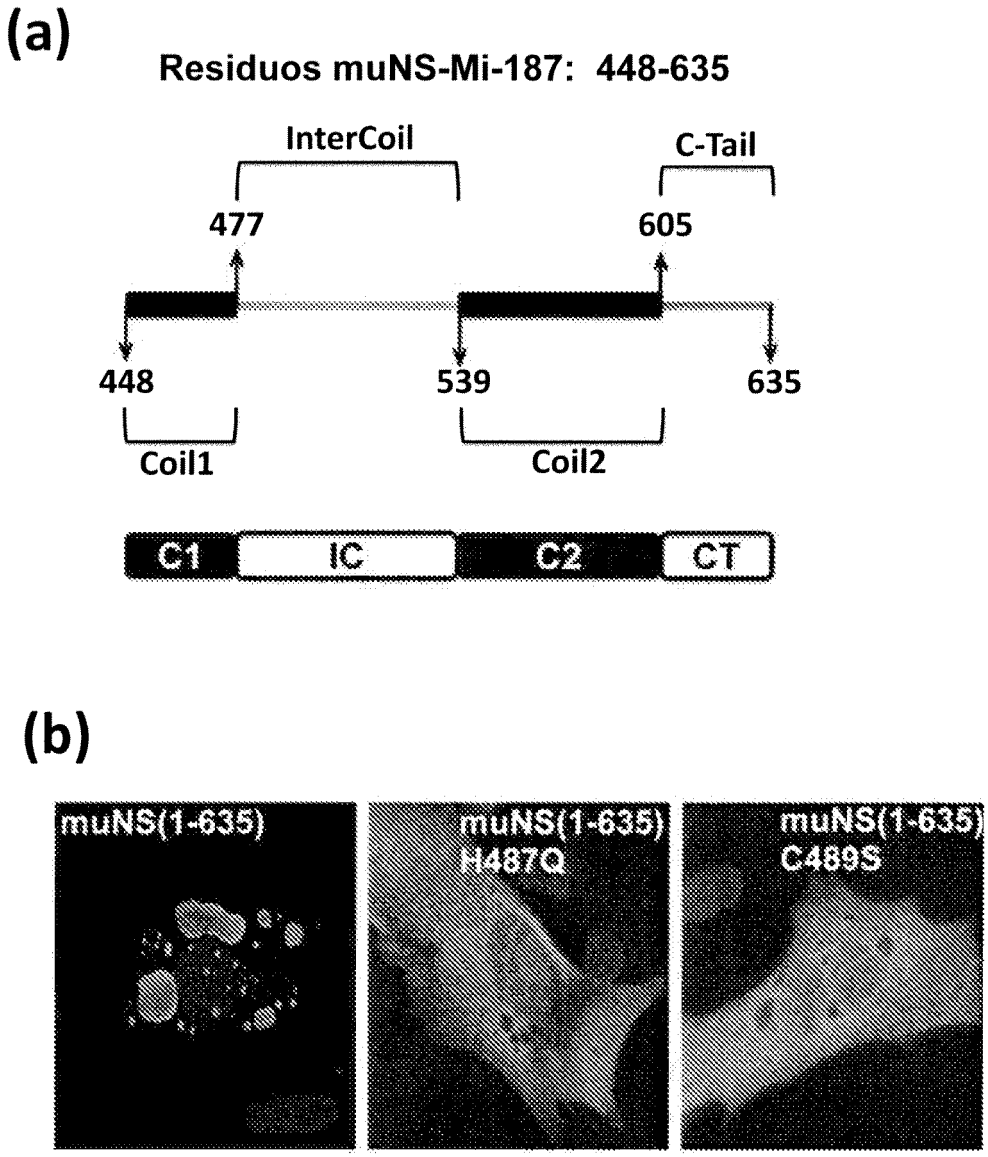

(a)
Residuos muNS-Mi-187: 448-635
InterCoil
C-Tail
477
605
448
539
635
Coil1
Coil2
C1
IC
C2
CT
(b)
muNS(1-635)
muNS(1-635)
H487Q
muNS(1-635)
C489S

FIG. 3

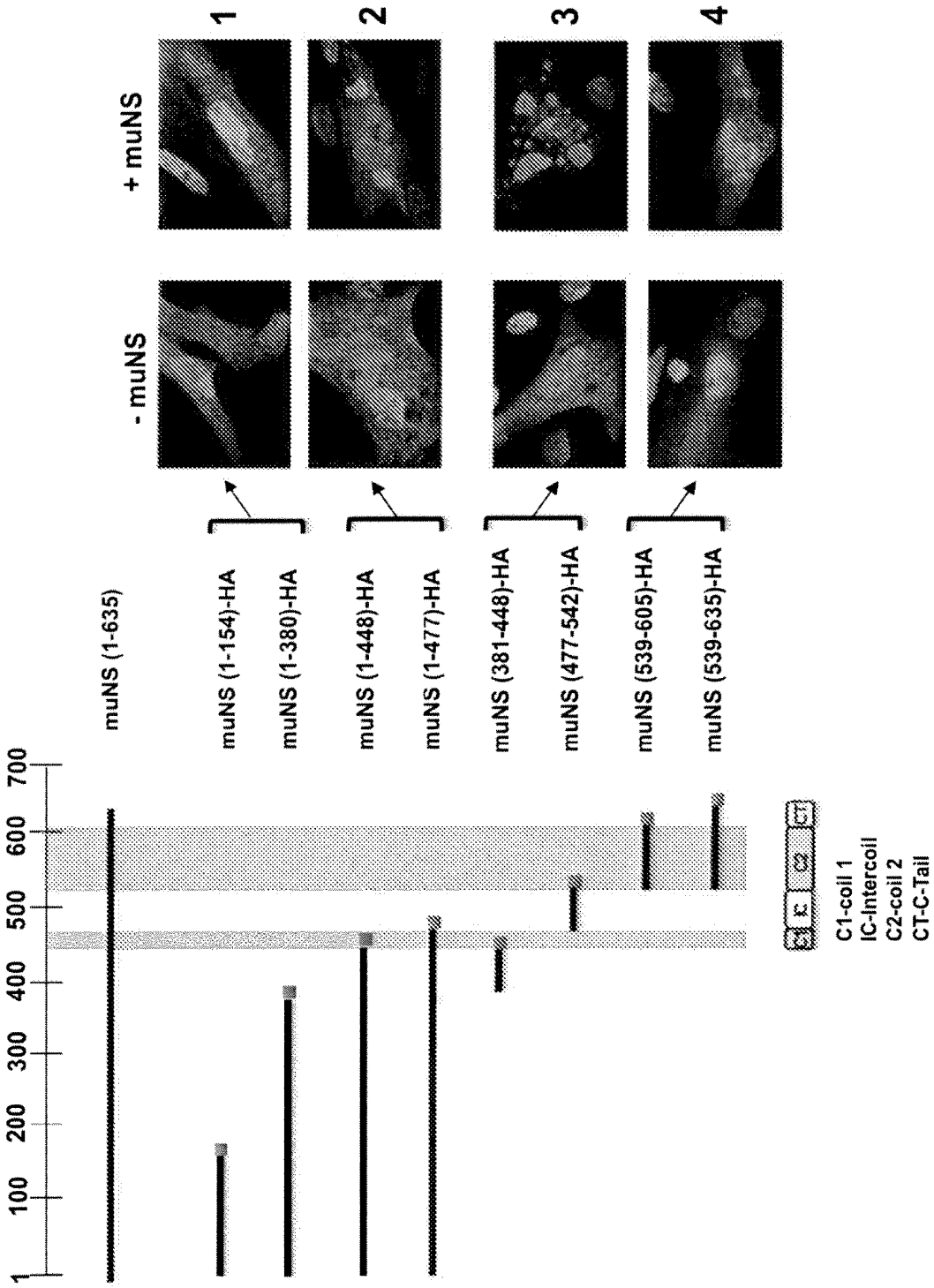

1
2
3
4
+ muNS
- muNS
muNS (1-635)
muNS (1-154)-HA
muNS (1-380)-HA
muNS (1-448)-HA
muNS (1-477)-HA
muNS (381-448)-HA
muNS (477-542)-HA
muNS (539-605)-HA
muNS (539-635)-HA
1
100
200
300
400
500
600
700
C1
IC
C2
CT
C1-coil 1
IC-Intercoil
C2-coil 2
CT-C-Tail

FIG. 4

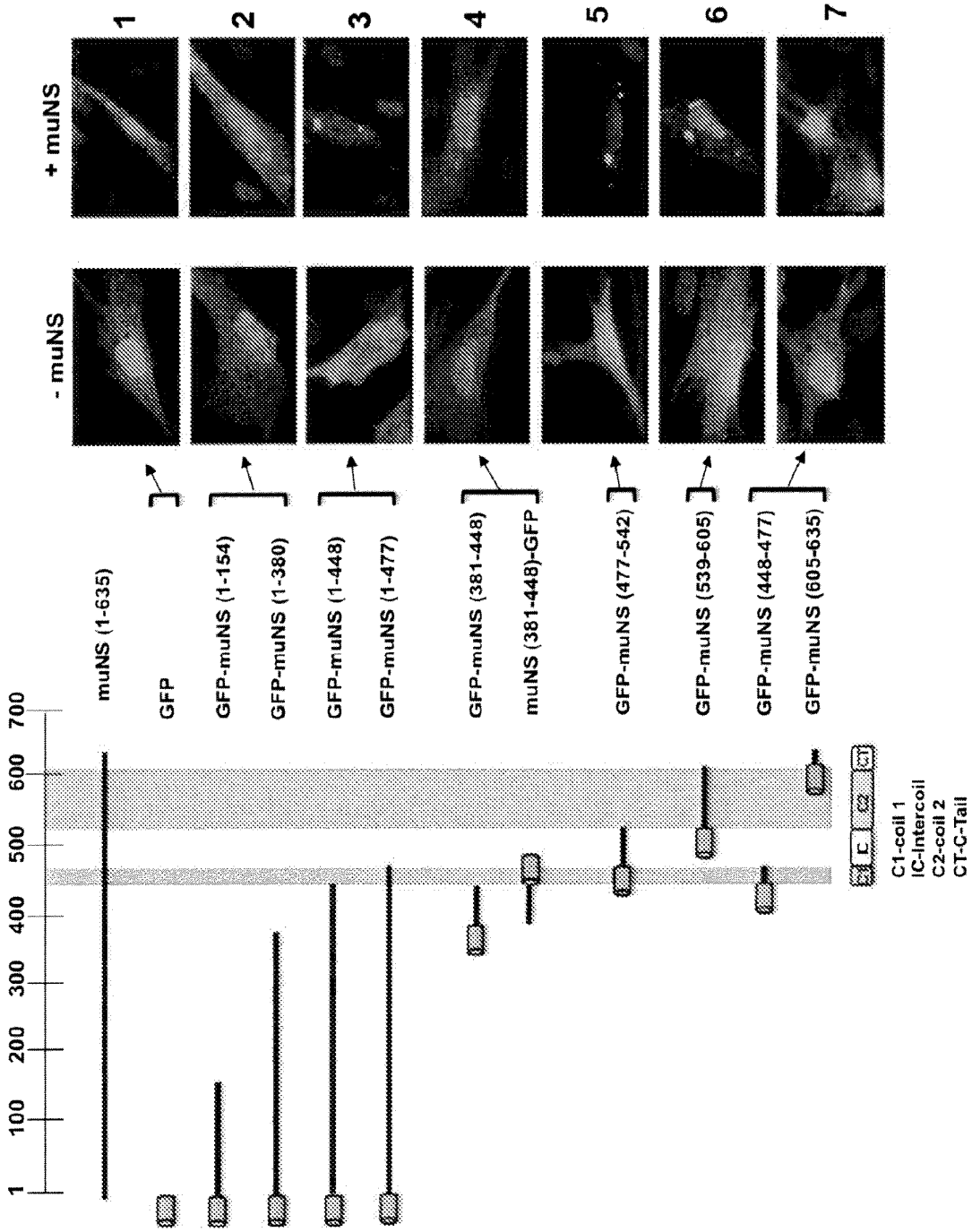

+ muNS
- muNS
1
2
3
4
5
6
7
muNS (1-635)
GFP
GFP-muNS (1-154)
GFP-muNS (1-380)
GFP-muNS (1-448)
GFP-muNS (1-477)
GFP-muNS (381-448)
muNS (381-448)-GFP
GFP-muNS (477-542)
GFP-muNS (539-605)
GFP-muNS (448-477)
GFP-muNS (605-635)
1
100
200
300
400
500
600
700
C1
IC
C2
CT
C1-coil 1
IC-Intercoil
C2-coil 2
CT-C-Tail

FIG. 5

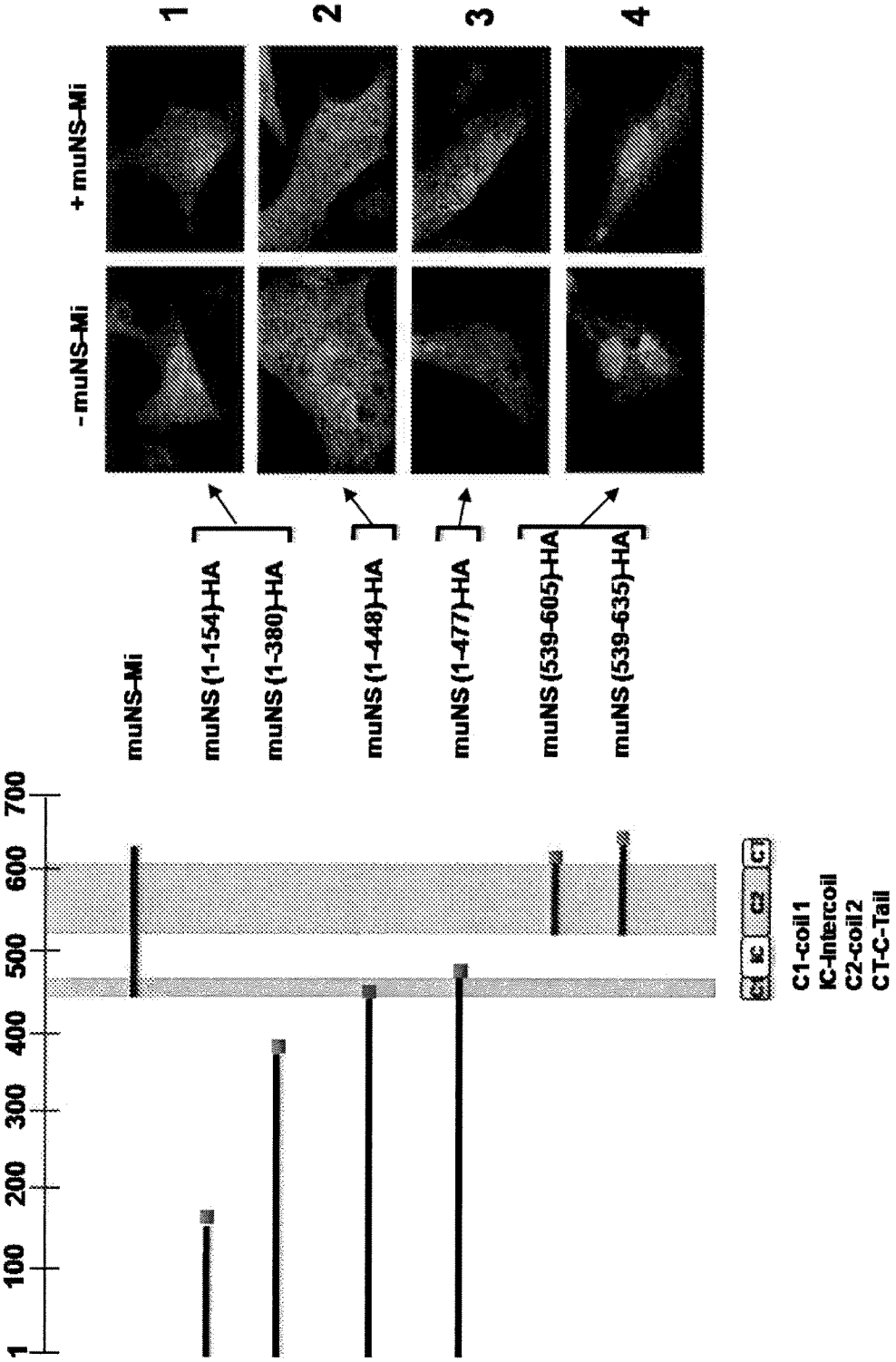

1
2
3
4
+ muNS-Mi
- muNS-Mi
muNS-Mi
muNS (1-154)-HA
muNS (1-380)-HA
muNS (1-448)-HA
muNS (1-477)-HA
muNS (539-605)-HA
muNS (539-635)-HA
1
100
200
300
400
500
600
700
C1
IC
C2
CT
C1-coil 1
IC-Intercoil
C2-coil 2
CT-C-Tail

FIG. 6

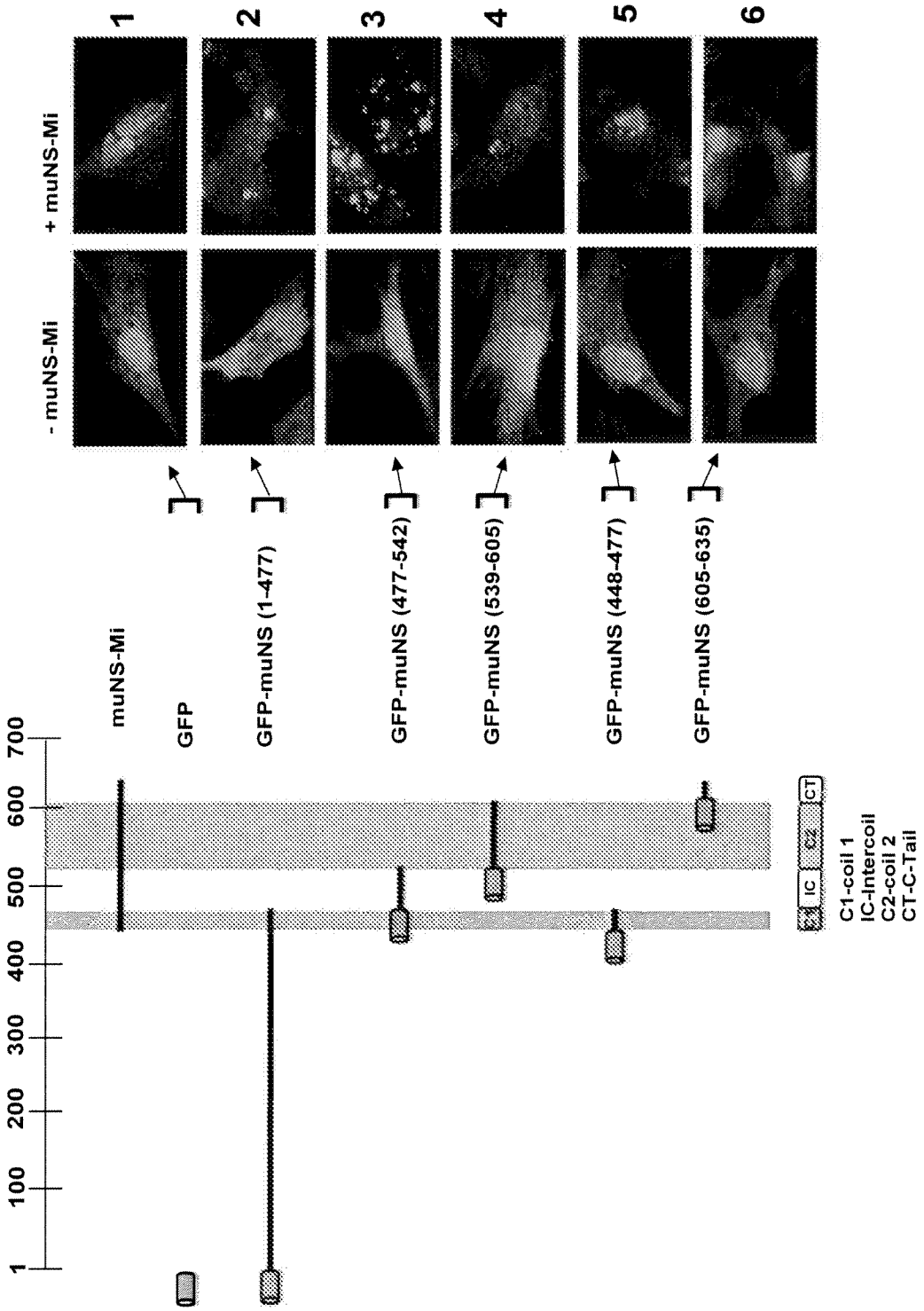

- muNS-Mi
+ muNS-Mi
1
2
3
4
5
6
muNS-Mi
GFP
GFP-muNS (1-477)
GFP-muNS (477-542)
GFP-muNS (539-605)
GFP-muNS (448-477)
GFP-muNS (605-635)
1
100
200
300
400
500
600
700
C1
IC
C2
CT
C1-coil 1
IC-Intercoil
C2-coil 2
CT-C-Tail

FIG. 7

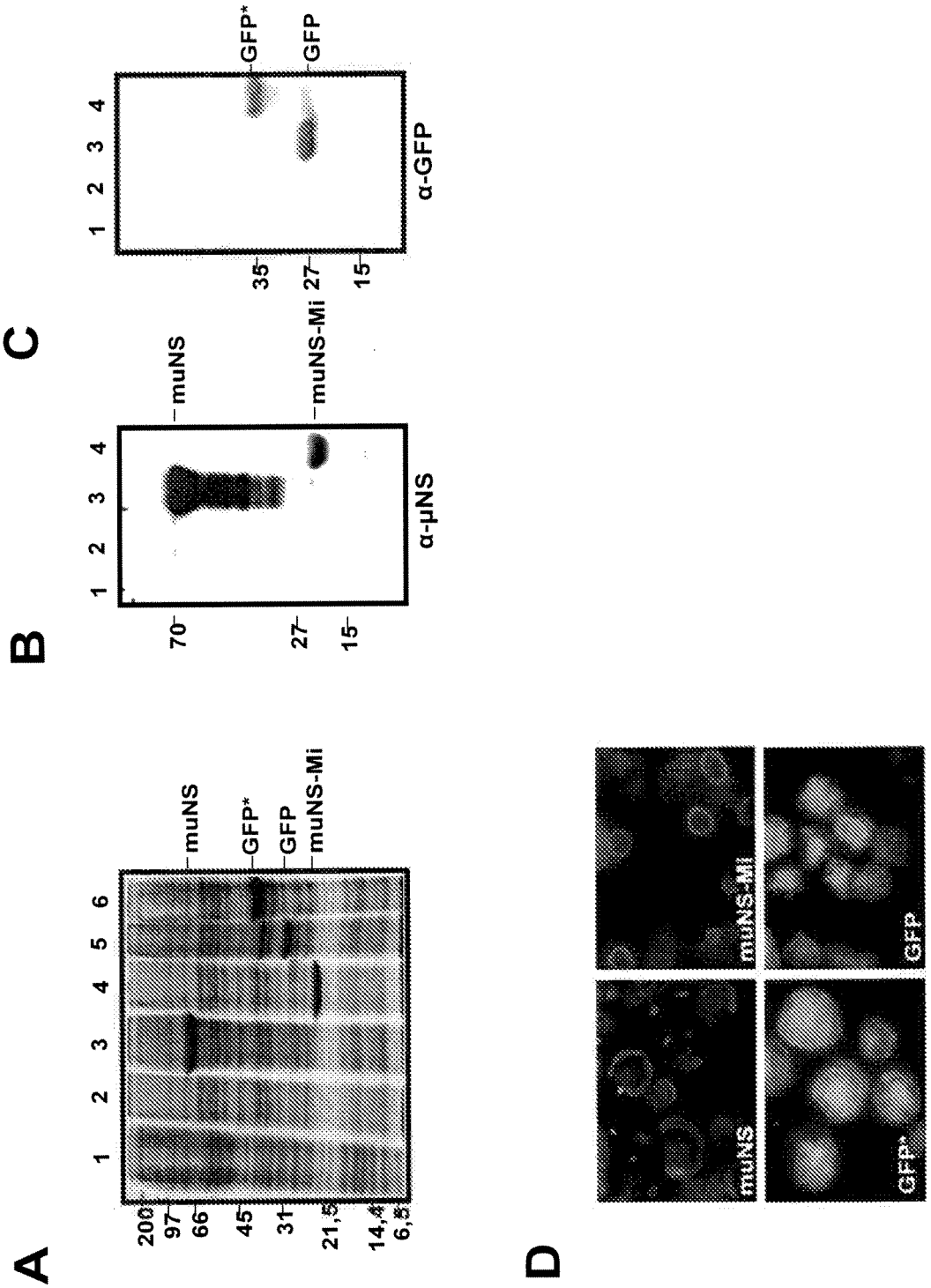

A
1 2 3 4 5 6
200
97
66
45
31
21,5
14,4
6,5
muNS
GFP*
GFP
muNS-Mi
B
1 2 3 4
70
27
15
muNS
muNS-Mi
α-μNS
C
1 2 3 4
35
27
15
GFP*
GFP
α-GFP
D
muNS
muNS-Mi
GFP*
GFP

FIG. 8

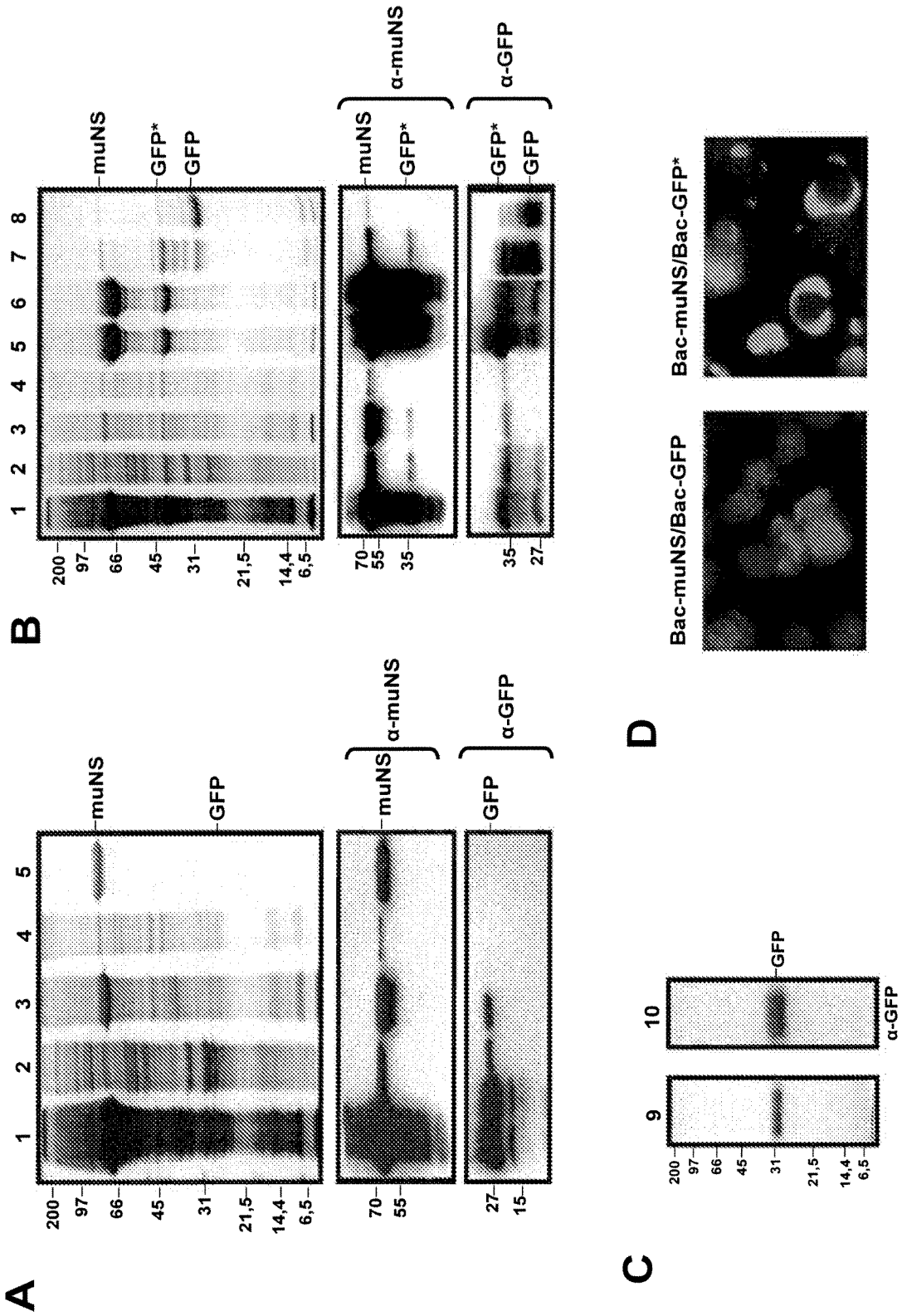

A
1
2
3
4
5
200
97
66
45
31
21,5
14,4
6,5
muNS
GFP
70
55
27
15
α-muNS
α-GFP
B
1
2
3
4
5
6
7
8
muNS
GFP*
GFP
70
55
35
27
C
9
10
GFP
α-GFP
D
Bac-muNS/Bac-GFP
Bac-muNS/Bac-GFP*

FIG. 9

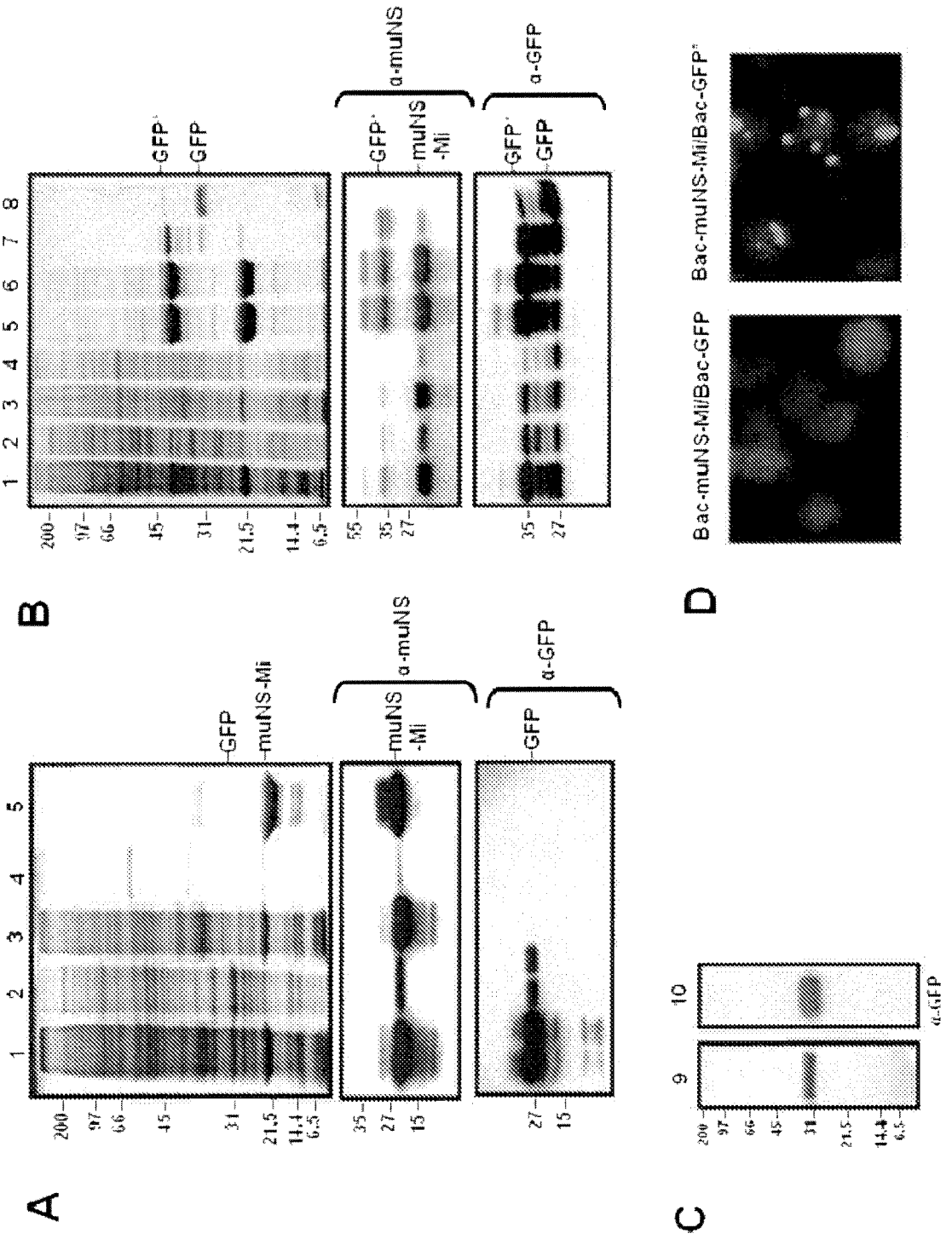

A
B
C
D
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
200
97
66
45
31
21.5
14.4
6.5
GFP
muNS-Mi
GFP'
GFP
muNS
-Mi
α-muNS
α-GFP
35
27
15
55
α-GFP
Bac-muNS-Mi/Bac-GFP
Bac-muNS-Mi/Bac-GFP*

FIG. 10

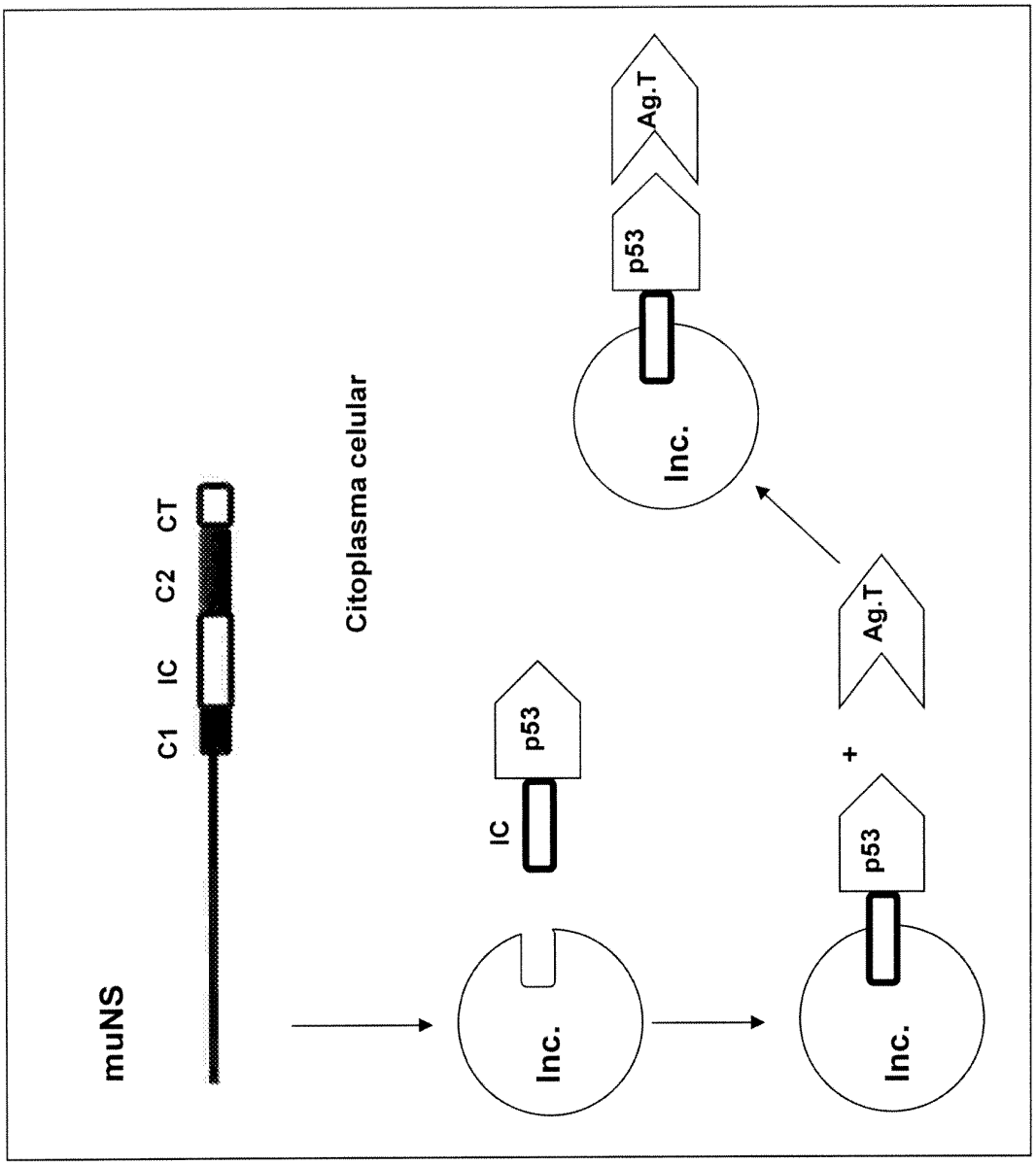

muNS
C1
IC
C2
CT
Citoplasma celular
Inc.
IC
p53
Inc.
p53
Ag.T
+
Inc.
p53
Ag.T

FIG. 11

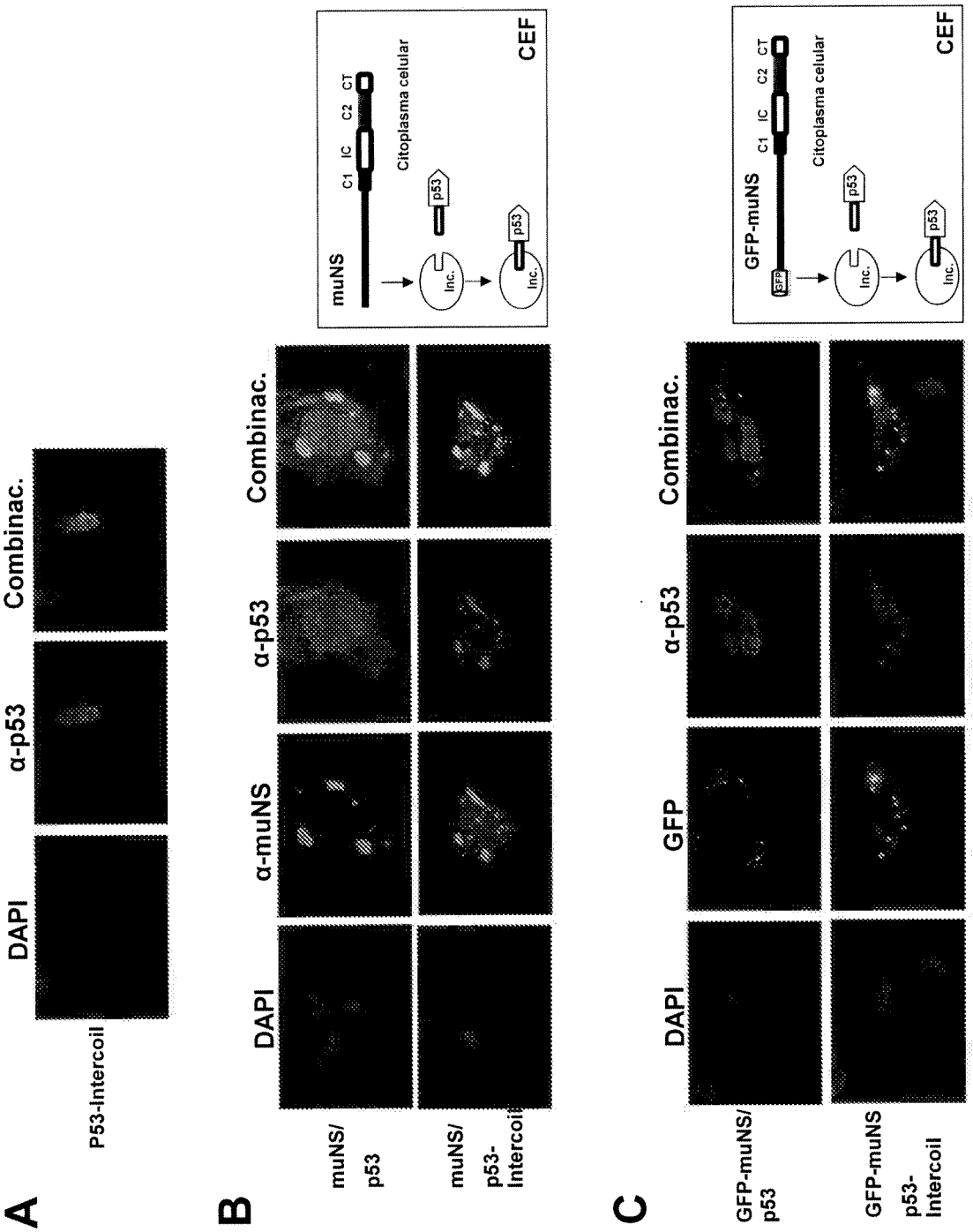

A
DAPI
α-p53
Combinac.
P53-Intercoil
B
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
muNS/
p53
muNS/
p53-
Intercoil
muNS
C1
IC
C2
CT
Citoplasma celular
p53
Inc.
CEF
C
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
GFP-muNS/
p53
GFP-muNS
p53-
Intercoil
GFP-muNS
GFP

FIG. 12

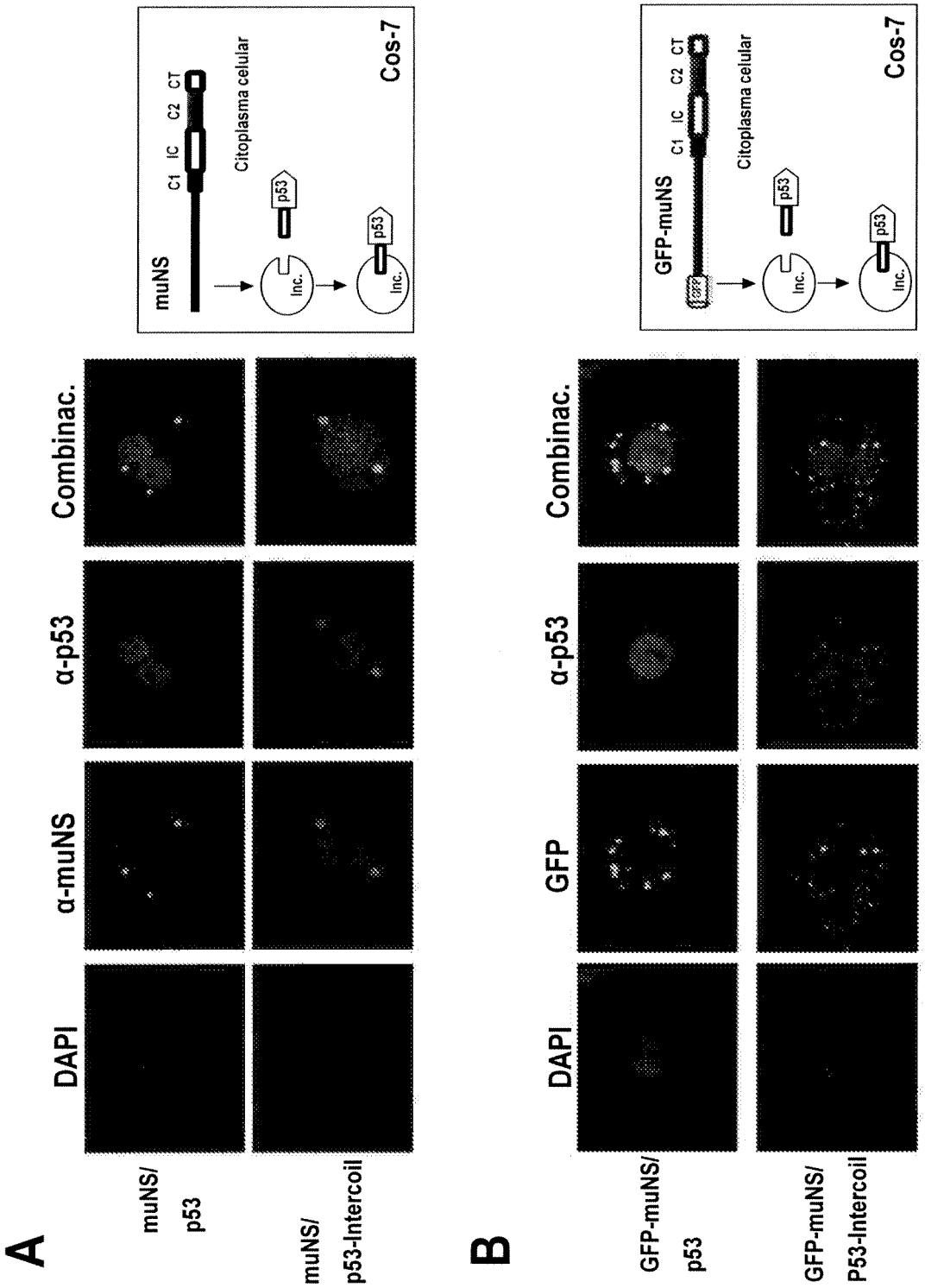

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
muNS/
p53
muNS/
p53-Intercoil
muNS
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
GFP-muNS/
p53
GFP-muNS/
P53-Intercoil
GFP-muNS
C1 IC C2 CT
GFP
Citoplasma celular
Inc.
p53
Cos-7

FIG. 13

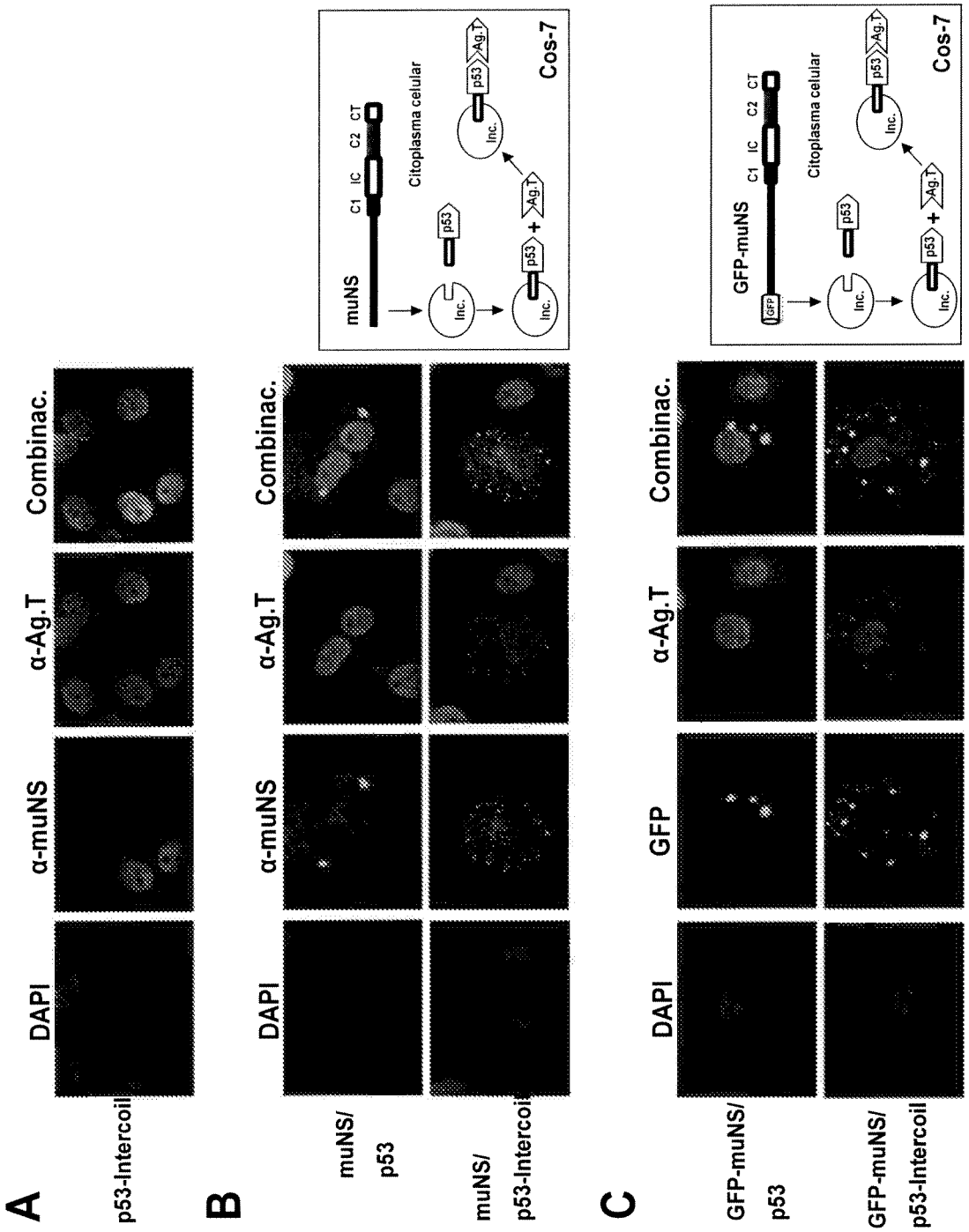

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
p53-Intercoil
B
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
muNS/
p53
muNS/
p53-Intercoil
muNS
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Ag.T
Cos-7
C
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
GFP-muNS/
p53
GFP-muNS/
p53-Intercoil
GFP-muNS
GFP

FIG. 14

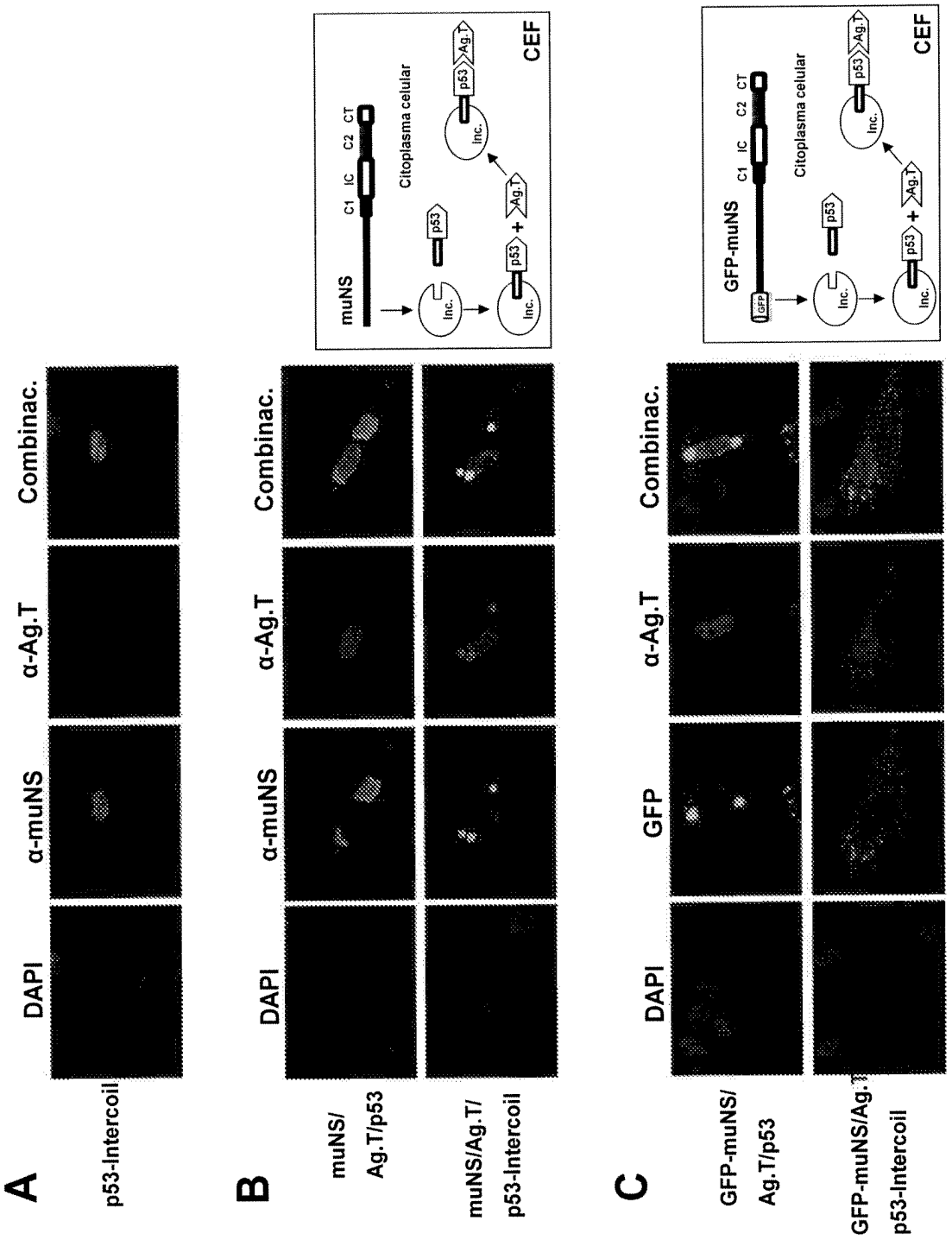

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
p53-Intercoil
B
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
muNS/
Ag.T/p53
muNS/Ag.T/
p53-Intercoil
muNS
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Ag.T
CEF
C
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
GFP-muNS/
Ag.T/p53
GFP-muNS/Ag.T/
p53-Intercoil
GFP-muNS
GFP

FIG. 15

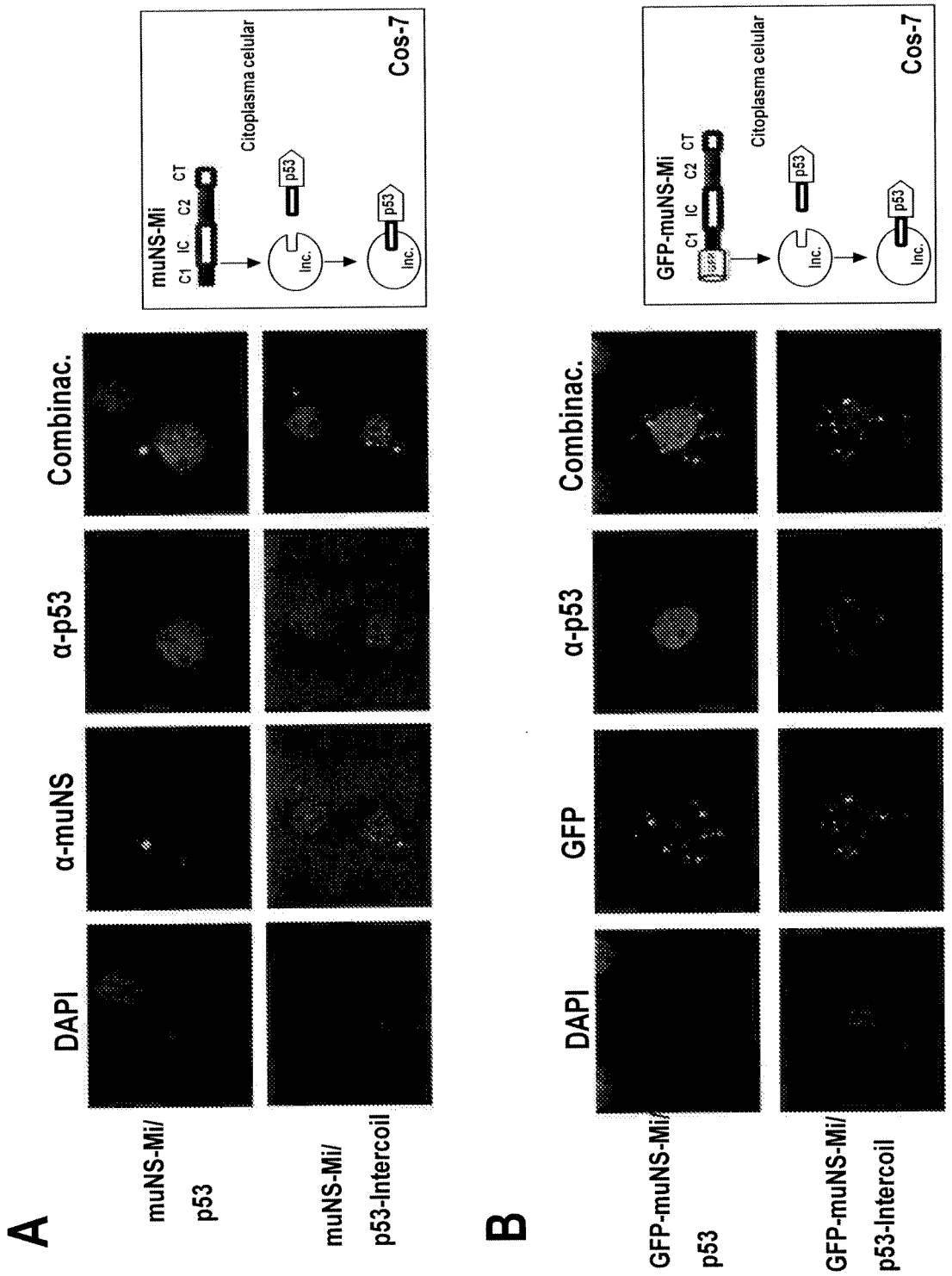

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
muNS-Mi/
p53
muNS-Mi/
p53-Intercoil
muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
GFP-muNS-Mi/
p53
GFP-muNS-Mi/
p53-Intercoil
GFP-muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Cos-7

FIG. 16

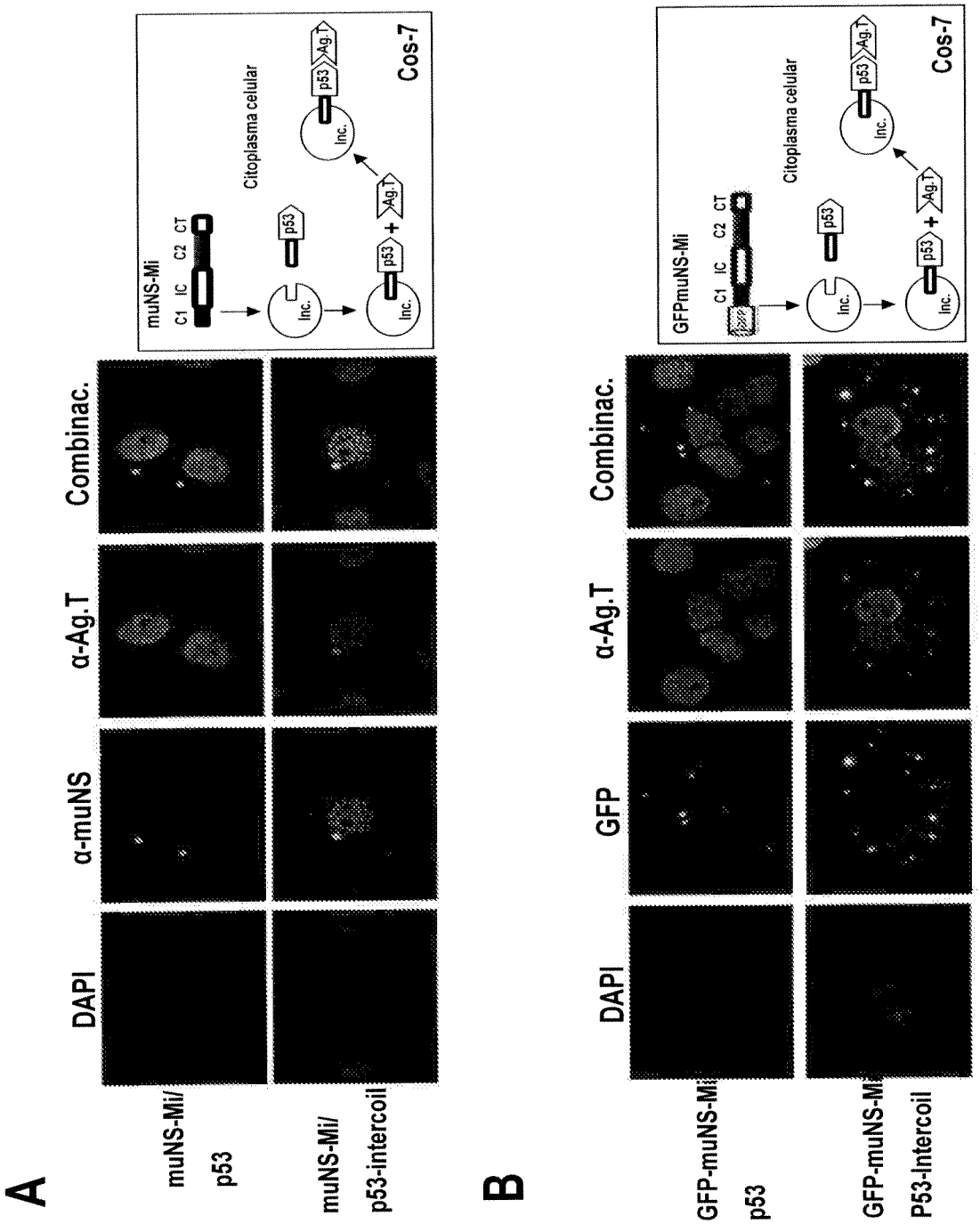

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
muNS-Mi/
p53
muNS-Mi/
p53-intercoil
muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Ag.T
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
GFP-muNS-Mi
p53
GFP-muNS-Mi
P53-Intercoil
GFPmuNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Inc.
p53
Ag.T
Cos-7

FIG. 17

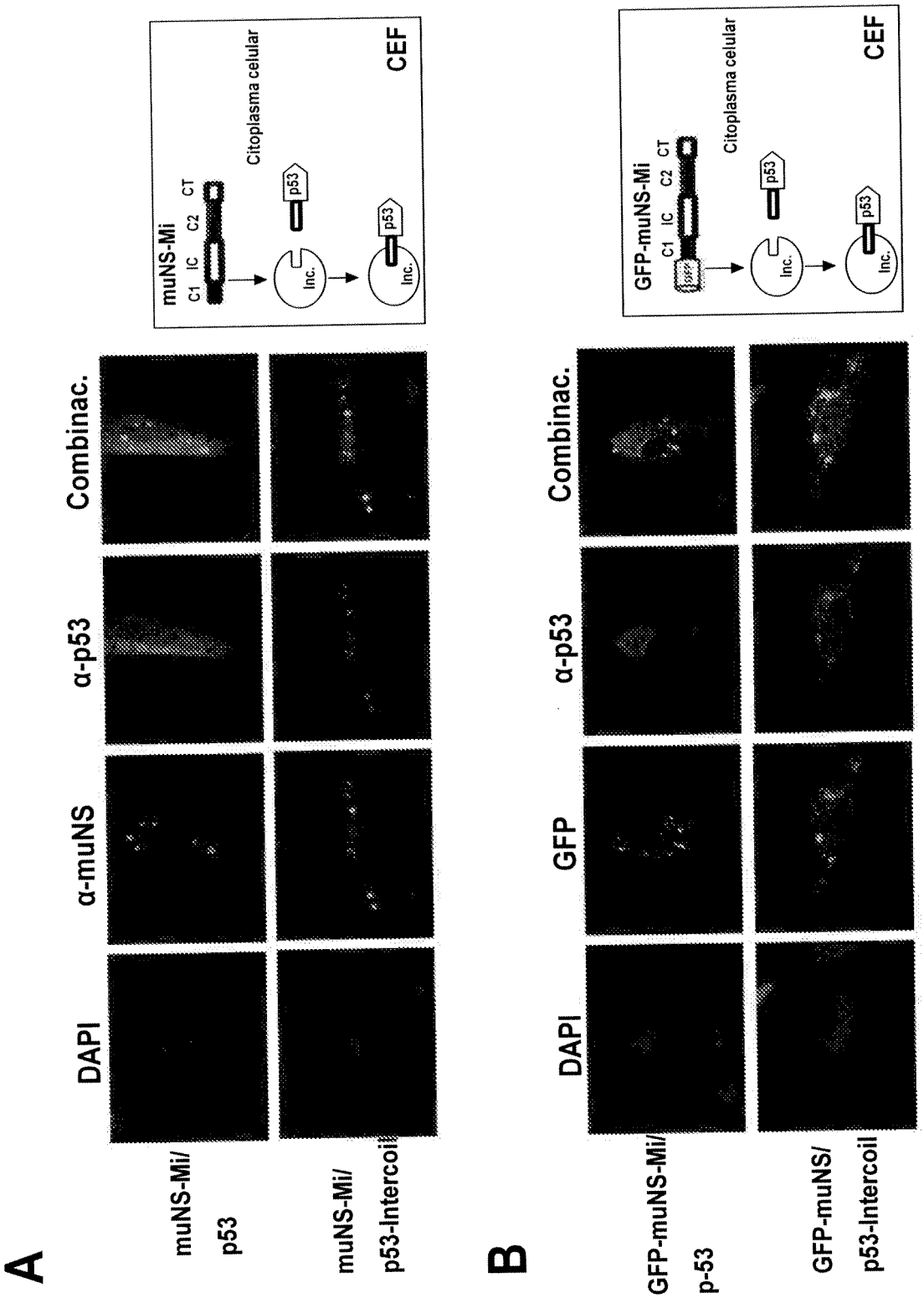

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
muNS-Mi/
p53
muNS-Mi/
p53-Intercoil
muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
p53
Inc.
CEF
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
GFP-muNS-Mi/
p-53
GFP-muNS/
p53-Intercoil
GFP-muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
p53
Inc.
CEF

FIG. 18

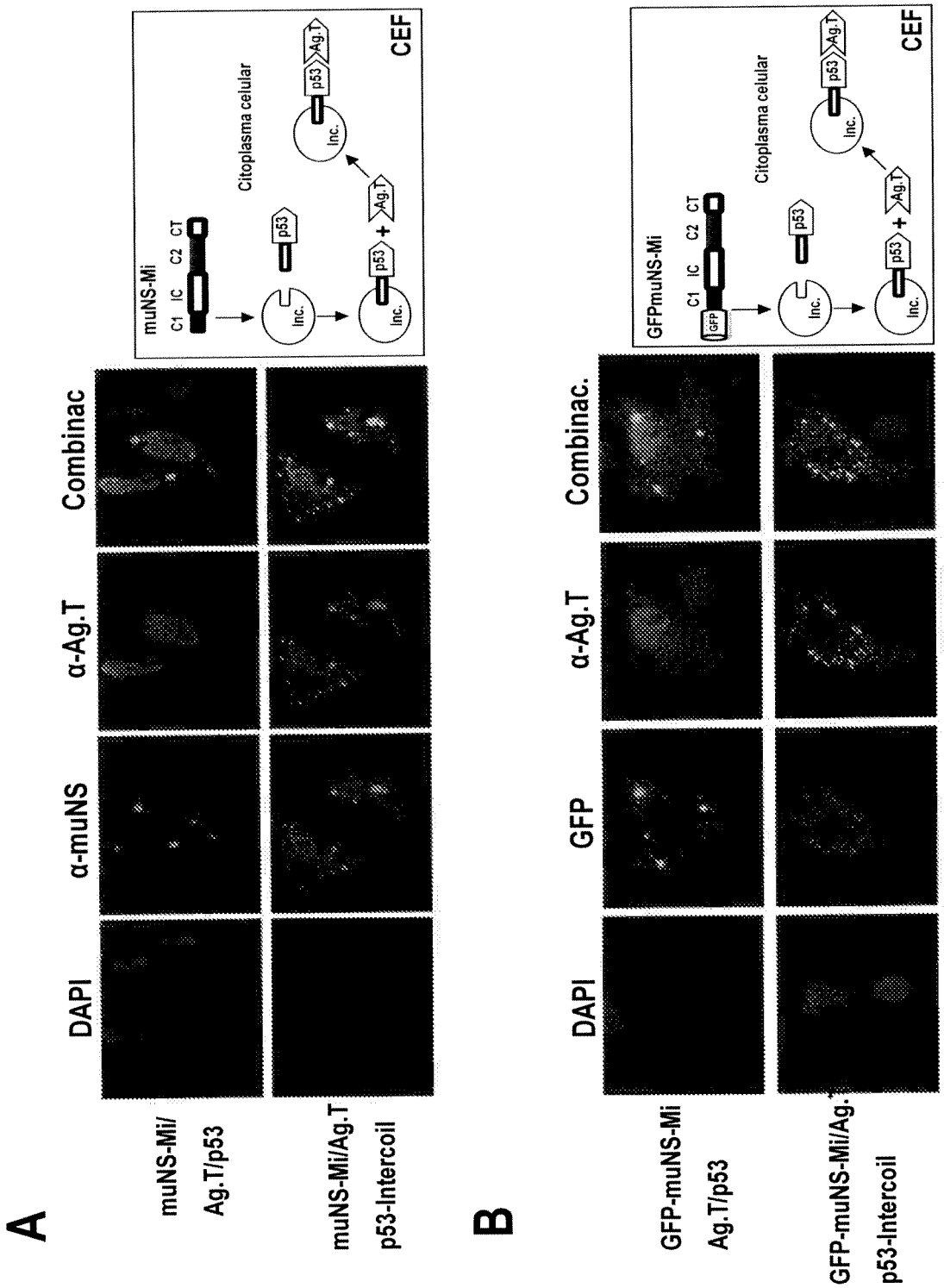

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac
muNS-Mi/
Ag.T/p53
muNS-Mi/Ag.T
p53-Intercoil
muNS-Mi
C1 IC C2 CT
Inc.
p53
Ag.T
Citoplasma celular
CEF
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
GFP-muNS-Mi
Ag.T/p53
GFP-muNS-Mi/Ag.
p53-Intercoil
GFPmuNS-Mi
GFP
C1 IC C2 CT
Inc.
p53
Ag.T
Citoplasma celular
CEF

FIG. 19

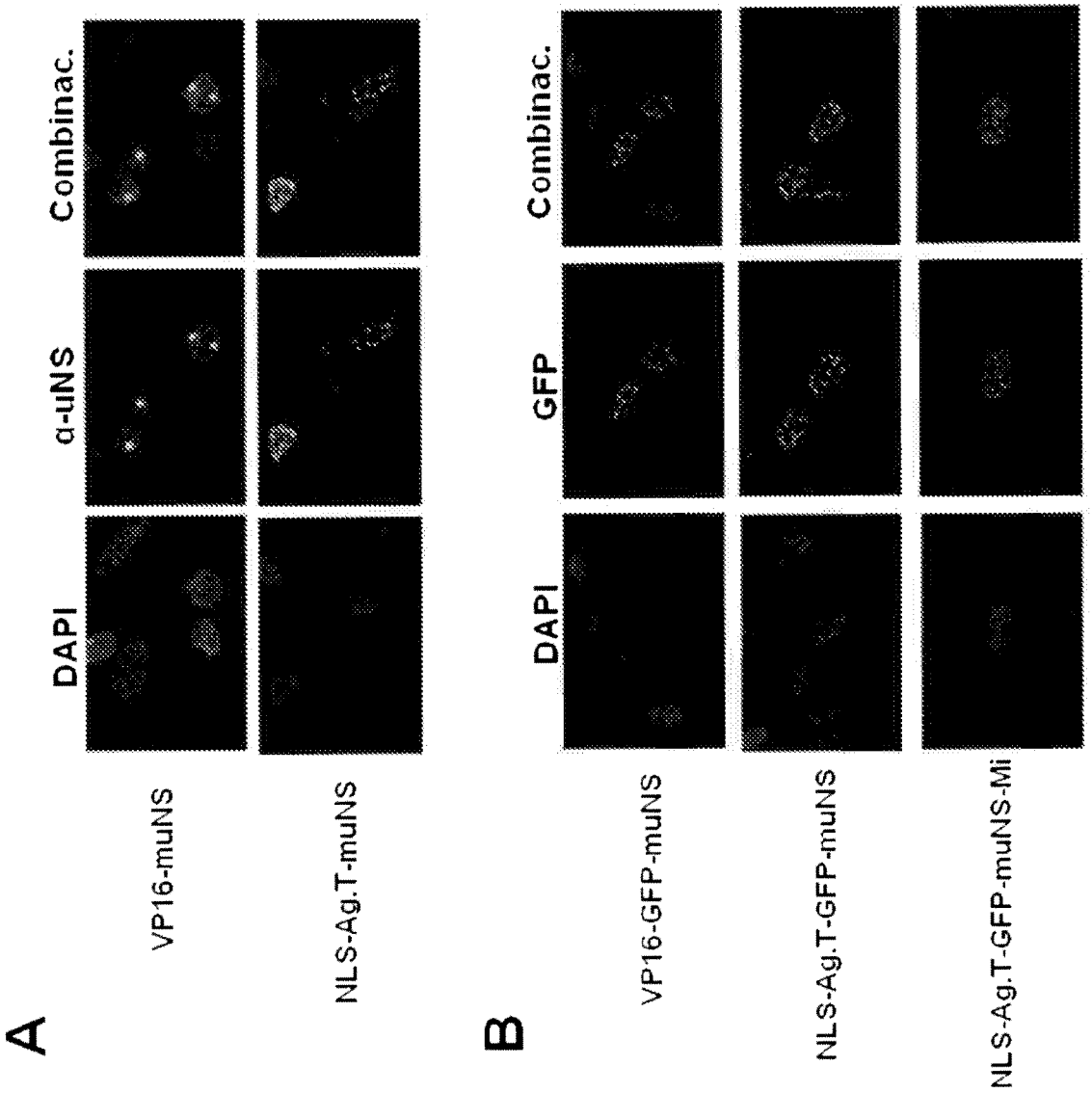

A
DAPI
α-uNS
Combinac.
VP16-muNS
NLS-Ag.T-muNS
B
DAPI
GFP
Combinac.
VP16-GFP-muNS
NLS-Ag.T-GFP-muNS
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi

FIG. 20

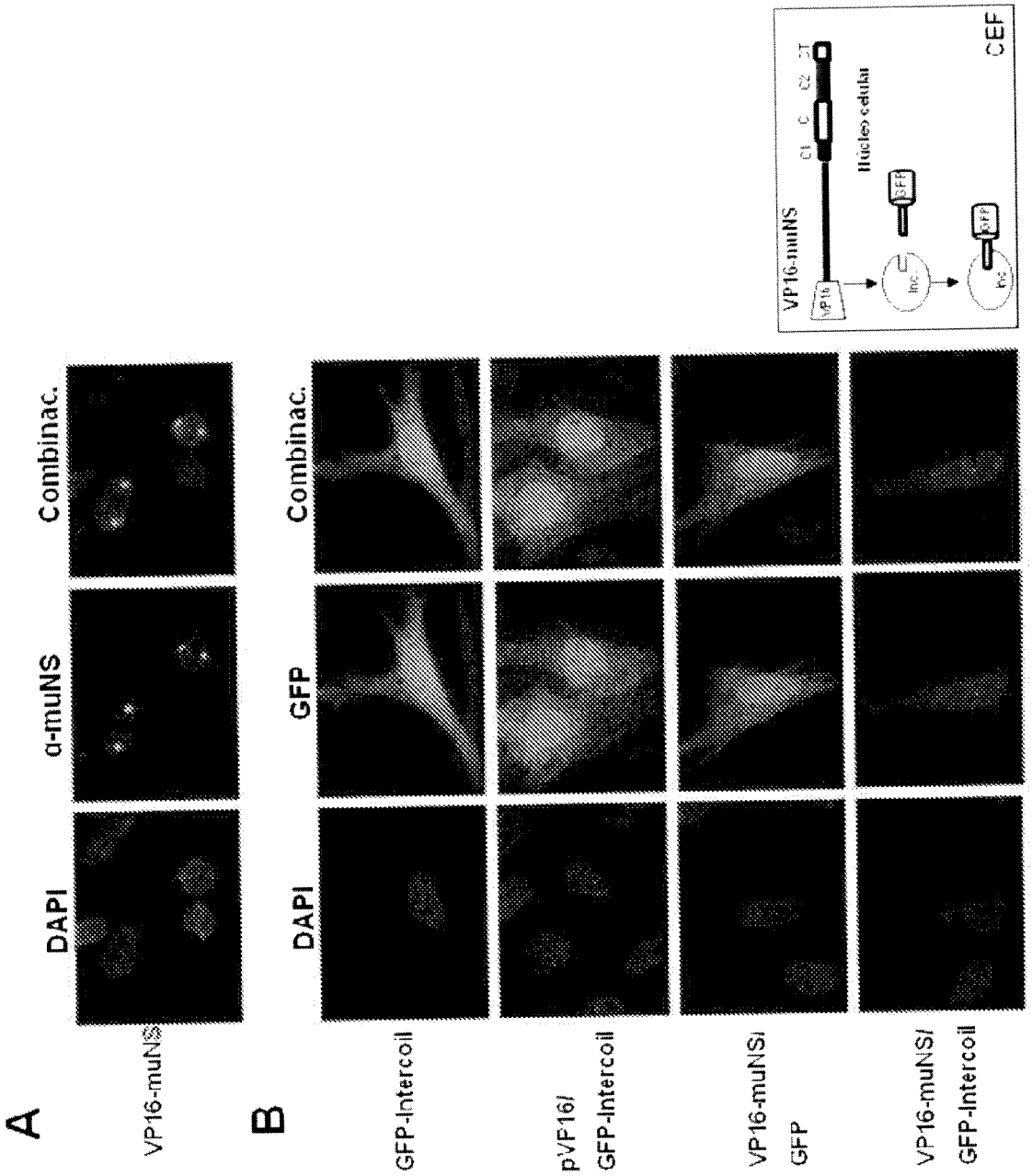

A
DAPI
α-muNS
Combinac.
VP16-muNS
B
DAPI
GFP
Combinac.
GFP-Intercoil
pVF16/
GFP-Intercoil
VP16-muNS/
GFP
VP16-muNS/
GFP-Intercoil
VP16-muNS
C1
C
C2
2T
Núcleo celular
Inc
GFP
CEF

FIG. 21

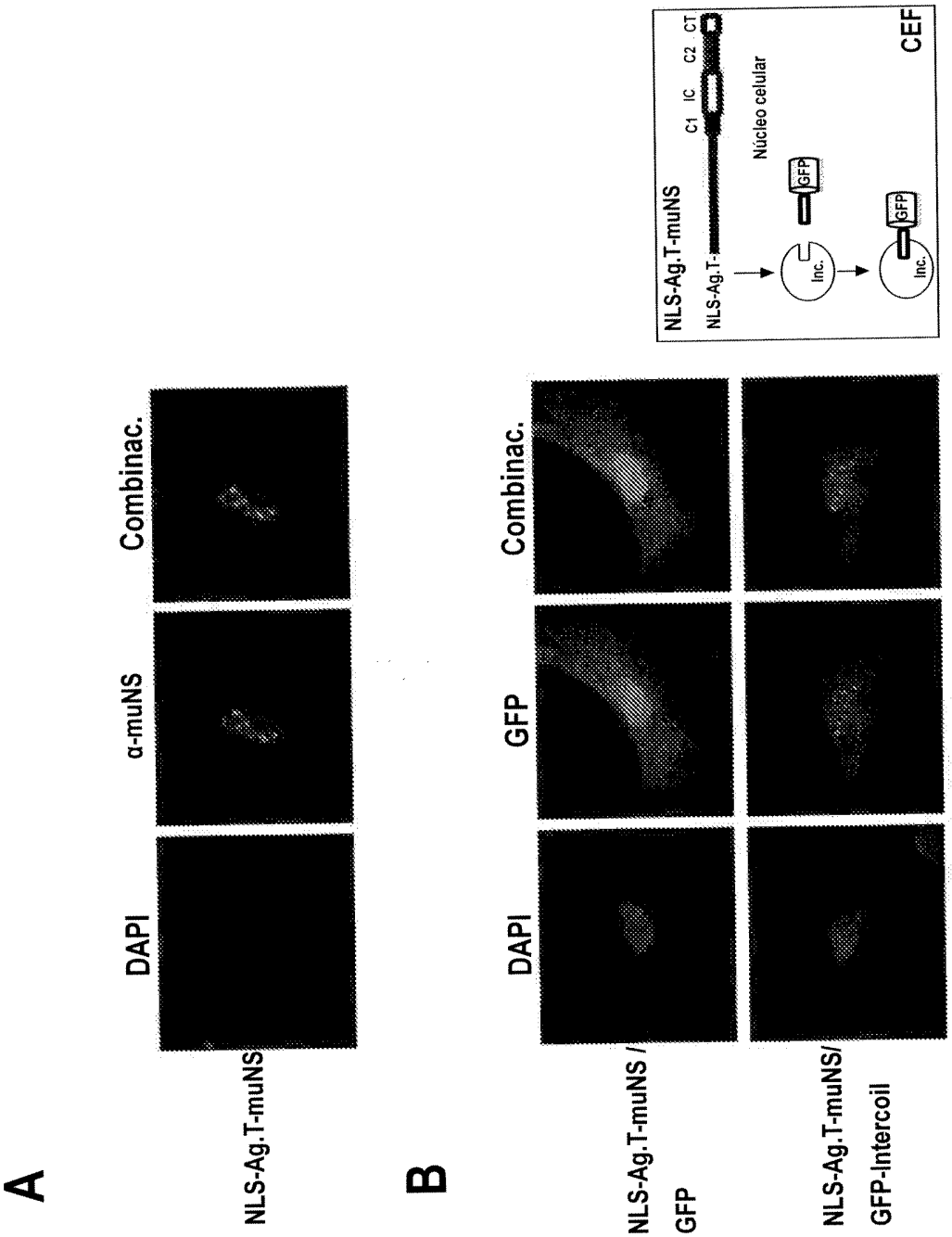

A
DAPI
α-muNS
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS
B
DAPI
GFP
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS /
GFP
NLS-Ag.T-muNS/
GFP-Intercoil
NLS-Ag.T-muNS
NLS-Ag.T-
C1
IC
C2
CT
Núcleo celular
Inc.
GFP
CEF

FIG. 22

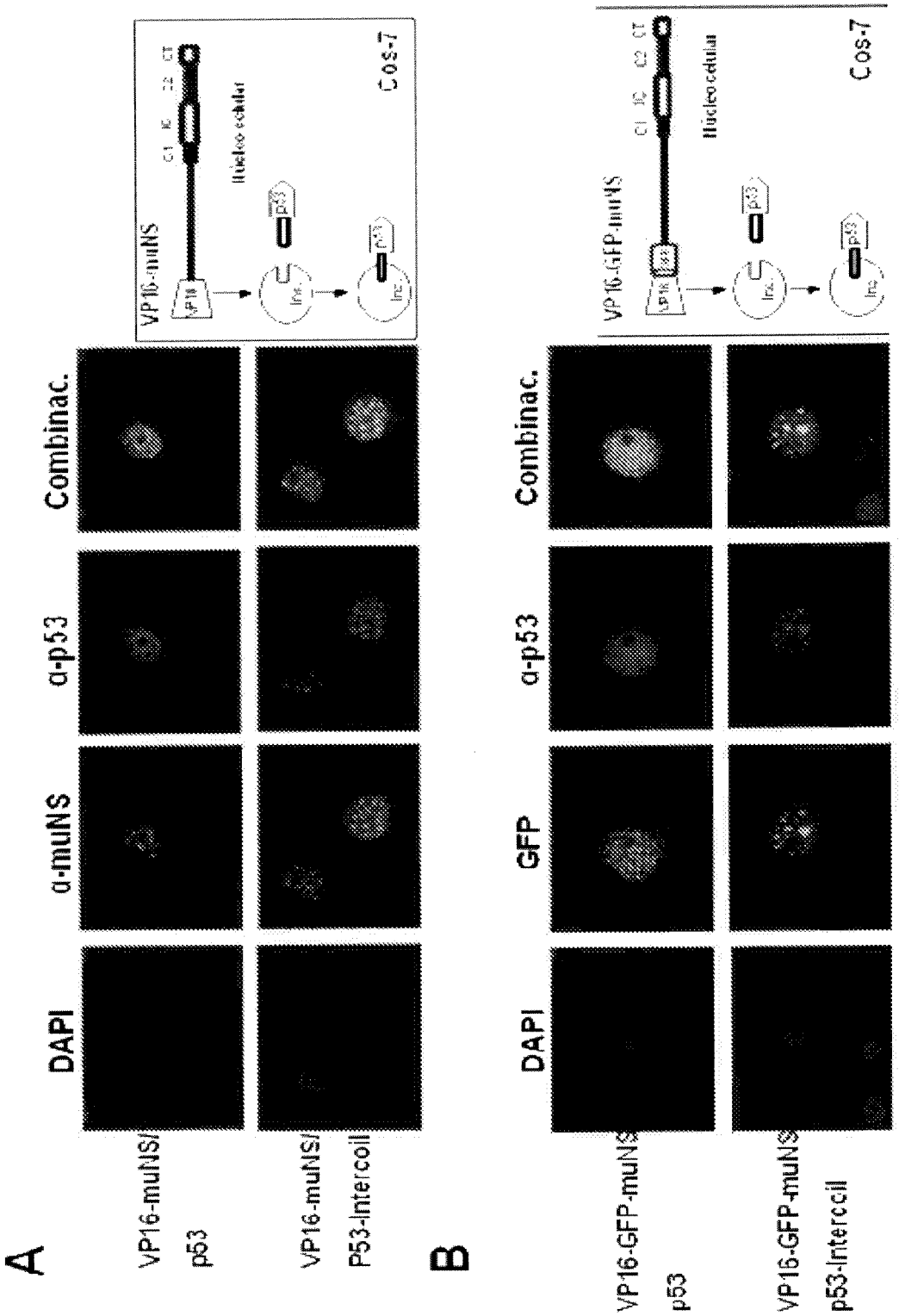

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
VP16-muNS/
p53
VP16-muNS/
P53-Intercoil
VP16-muNS
Nucleocelular
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
VP16-GFP-muNS/
p53
VP16-GFP-muNS/
p53-Intercoil
VP16-GFP-muNS
Nucleocelular
Cos-7

FIG. 23

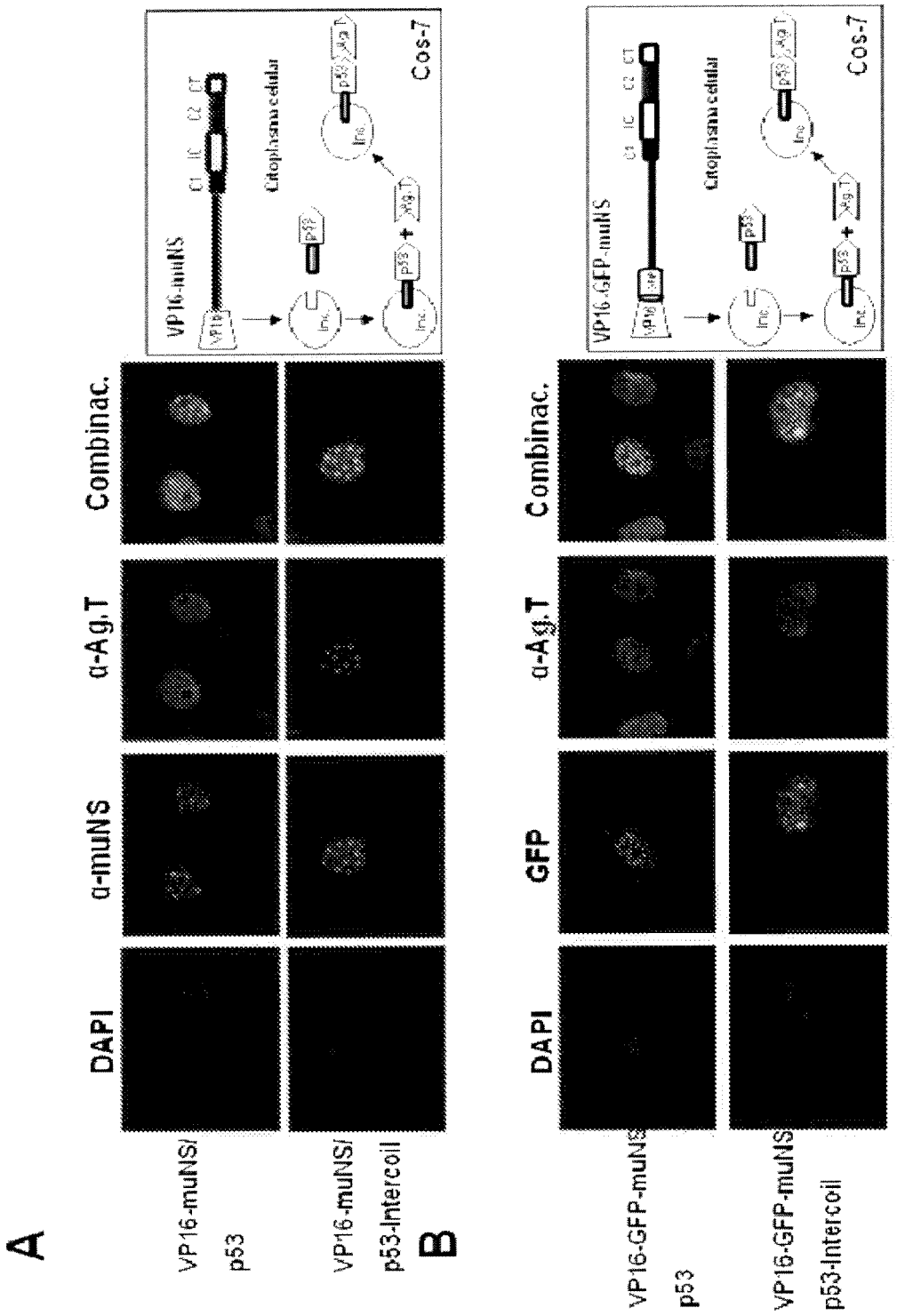

A
VP16-muNS/
p53
VP16-muNS/
p53-Intercoil
B
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
VP16-muNS
C1 IC C2 CT
VP16
Citoplasma celular
p53
Ag.T
Inc
Cos-7
VP16-GFP-muNS/
p53
VP16-GFP-muNS/
p53-Intercoil
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
VP16-GFP-muNS
C1 IC C2 CT
Citoplasma celular
Cos-7

FIG. 24

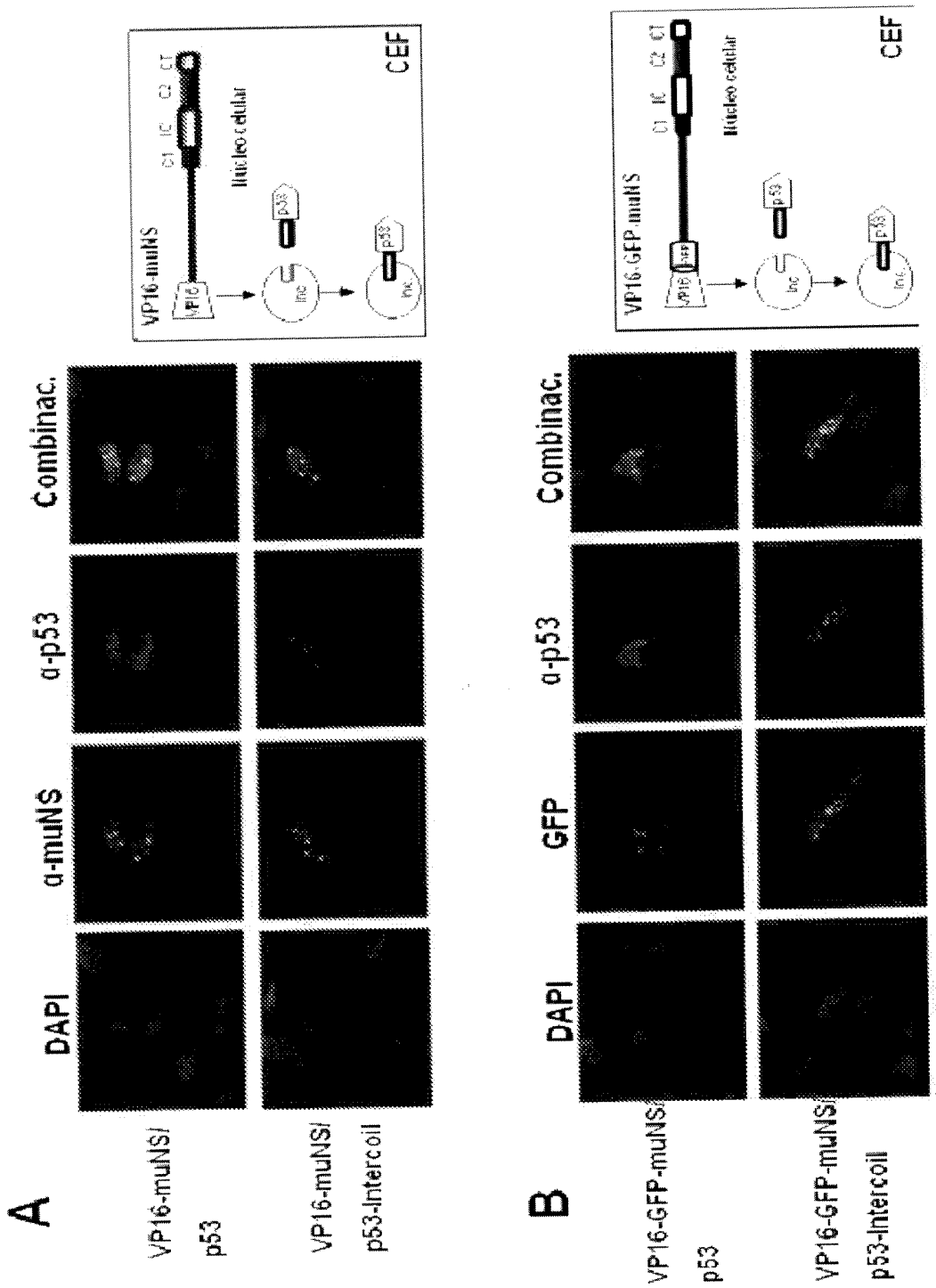

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
VP16-muNS/
p53
VP16-muNS/
p53-Intercoil
VP16-muNS
C1 IC C2 CT
VP16
Núcleo celular
Inc
p53
CEF
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
VP16-GFP-muNS/
p53
VP16-GFP-muNS/
p53-Intercoil
VP16-GFP-muNS
C1 IC C2 CT
GFP
Núcleo celular
Inc
p53
CEF

FIG. 25

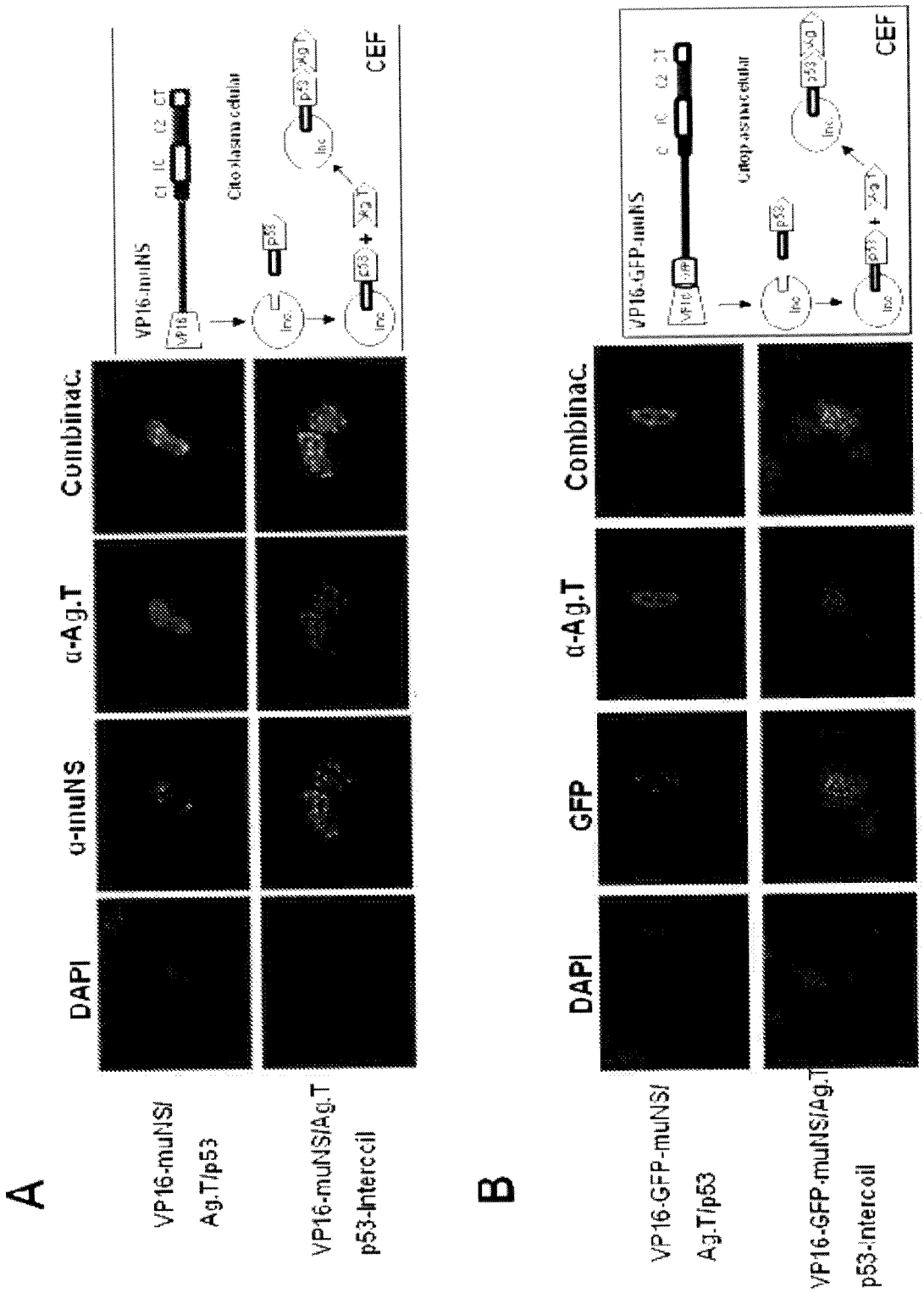

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
VP16-muNS/
Ag.T/p53
VP16-muNS/Ag.T
p53-intercoil
VP16-muNS
Citoplasma celular
CEF
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
VP16-GFP-muNS/
Ag.T/p53
VP16-GFP-muNS/Ag.T
p53-intercoil
VP16-GFP-muNS
Citoplasma celular
CEF

FIG. 26

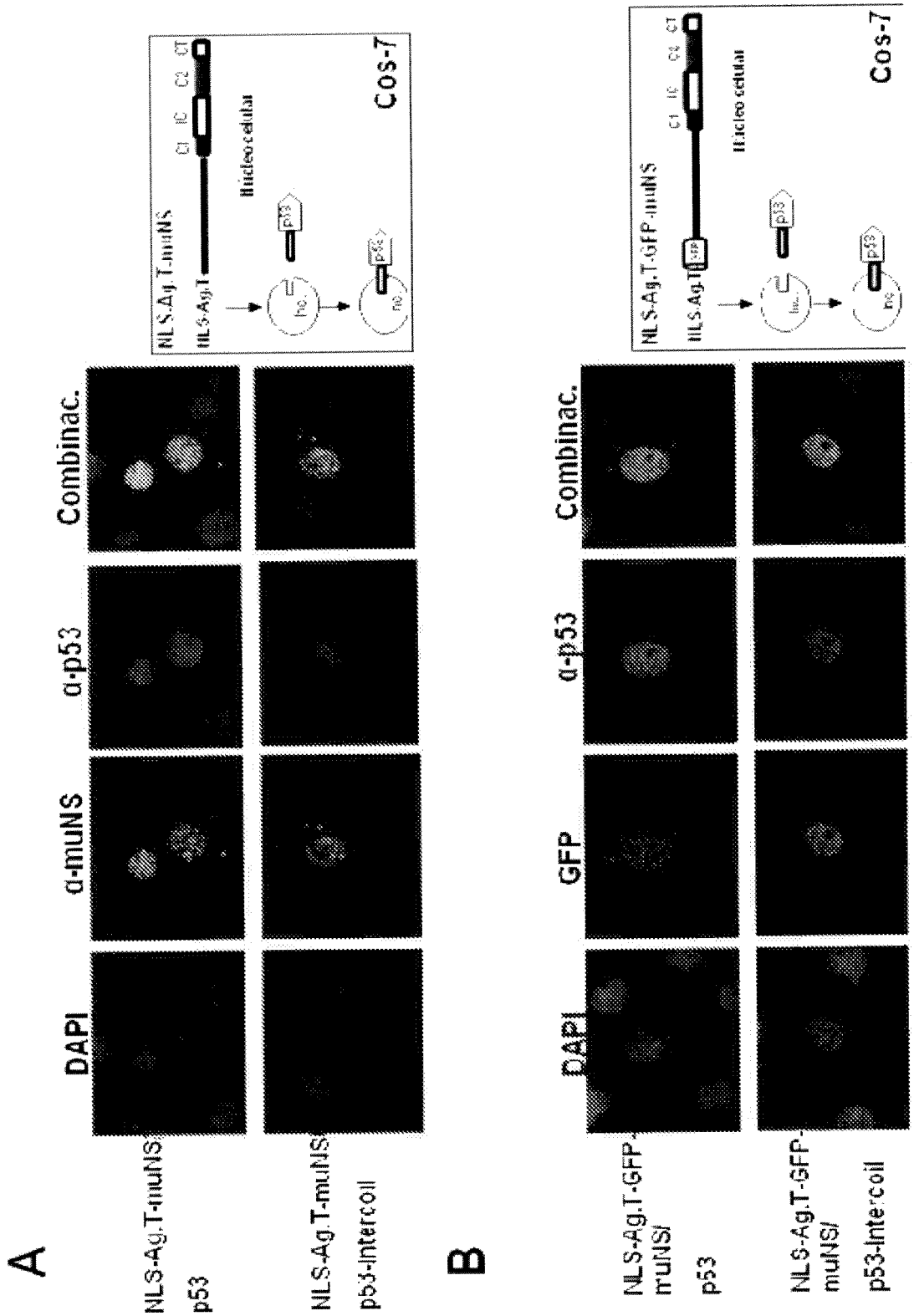

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS
p53
NLS-Ag.T-muNS
p53-intercoil
NLS-Ag.T-muNS
NLS-Ag.T
C1 IC C2 C1
Núcleo celular
p53
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS
NLS-Ag.T
C1 IC C2 C1
Núcleo celular
p53
Cos-7
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53-Intercoil

FIG. 27

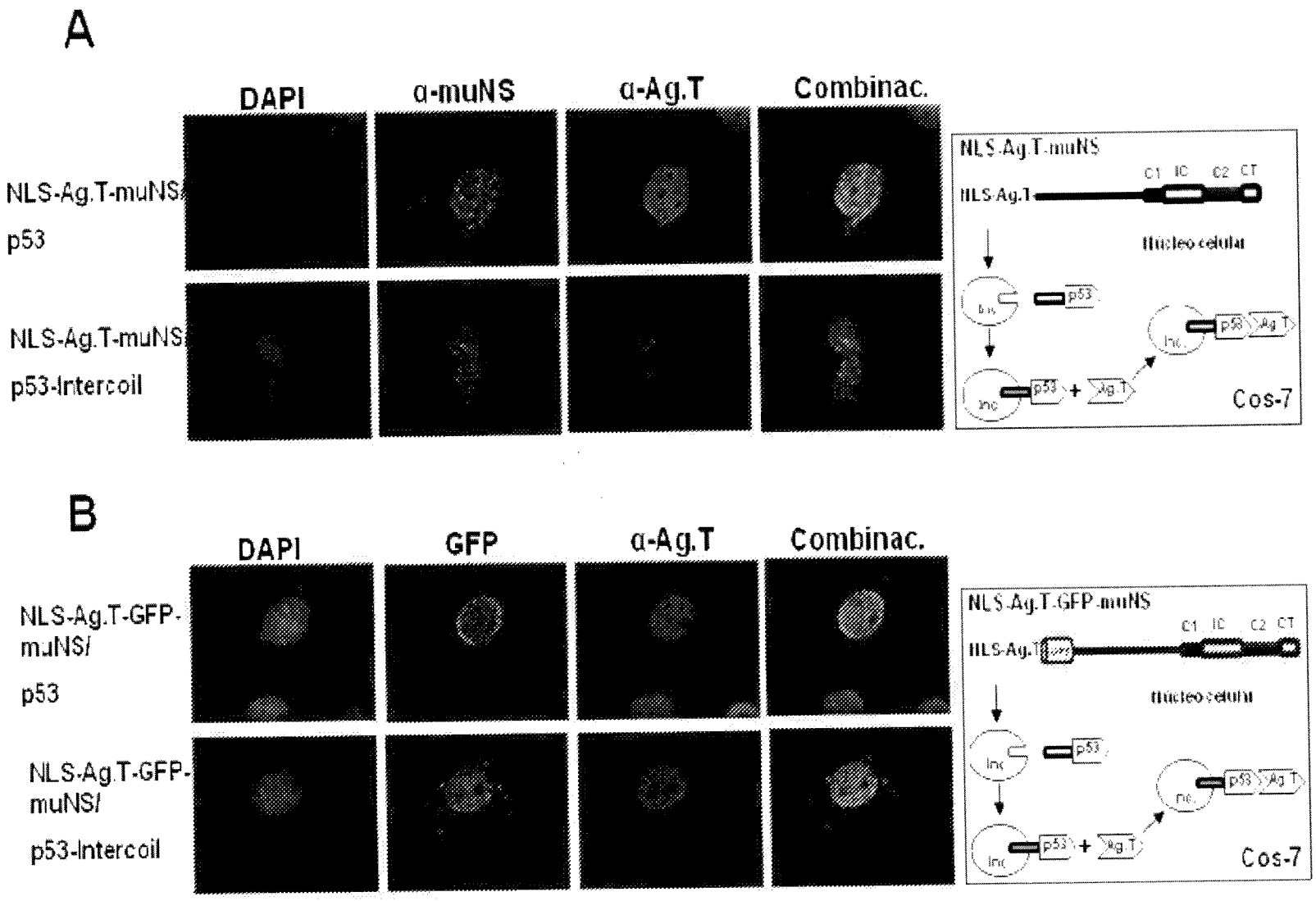

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS/
p53
NLS-Ag.T-muNS/
p53-Intercoil
NLS-Ag.T-muNS
C1 IC C2 CT
NLS-Ag.T
Núcleo celular
p53
Inc
Ag.T
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53-Intercoil
NLS-Ag.T-GFP-muNS
C1 IC C2 CT
NLS-Ag.T
GFP
Núcleo celular
p53
Inc
Ag.T
Cos-7

FIG. 28

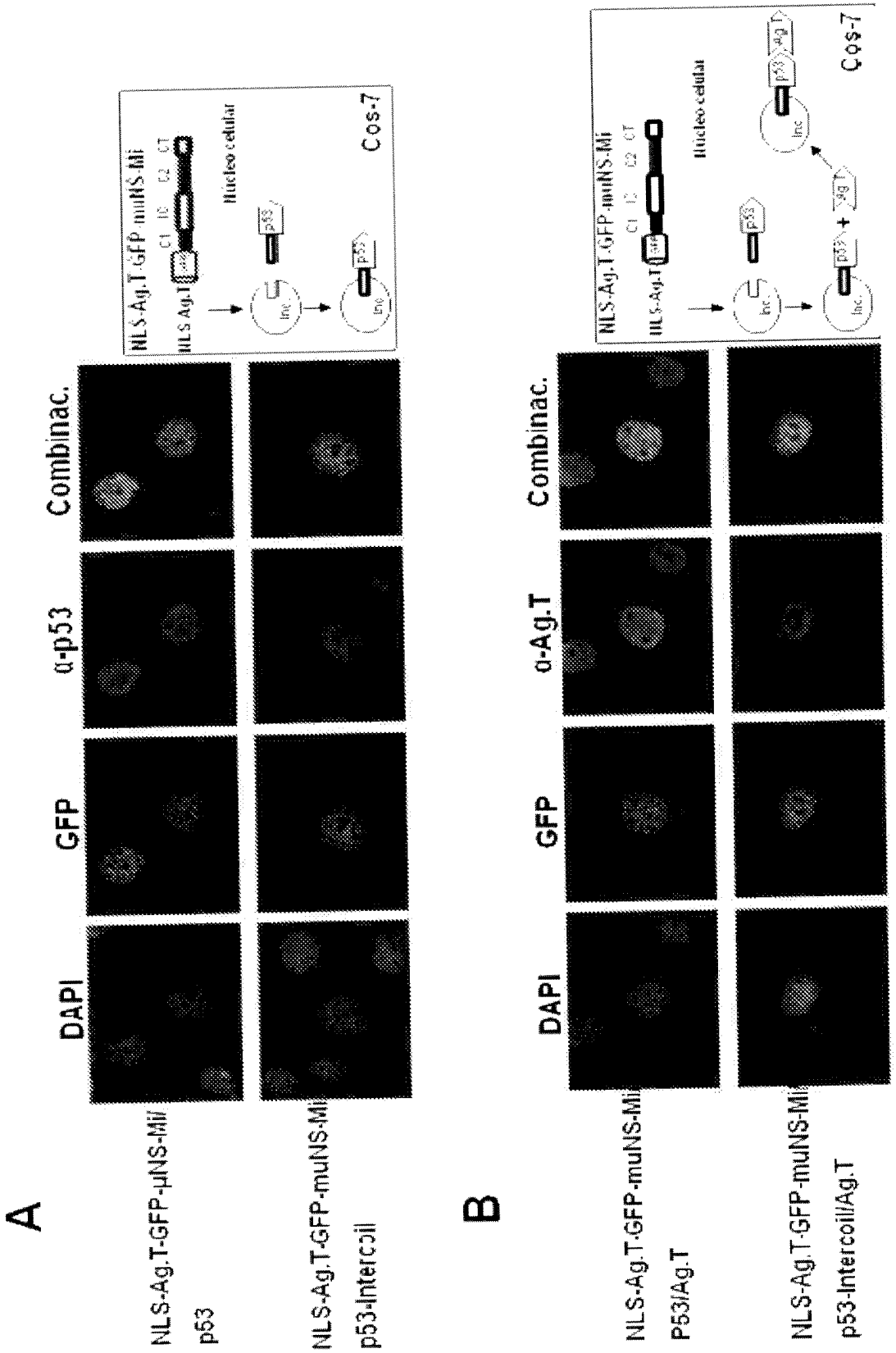

A
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-μNS-Mi
p53
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
p53-Intercoil
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
Nucleo celular
Cos-7
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
P53/Ag.T
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
p53-Intercoil/Ag.T
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
Nucleo celular
Cos-7

FIG. 29

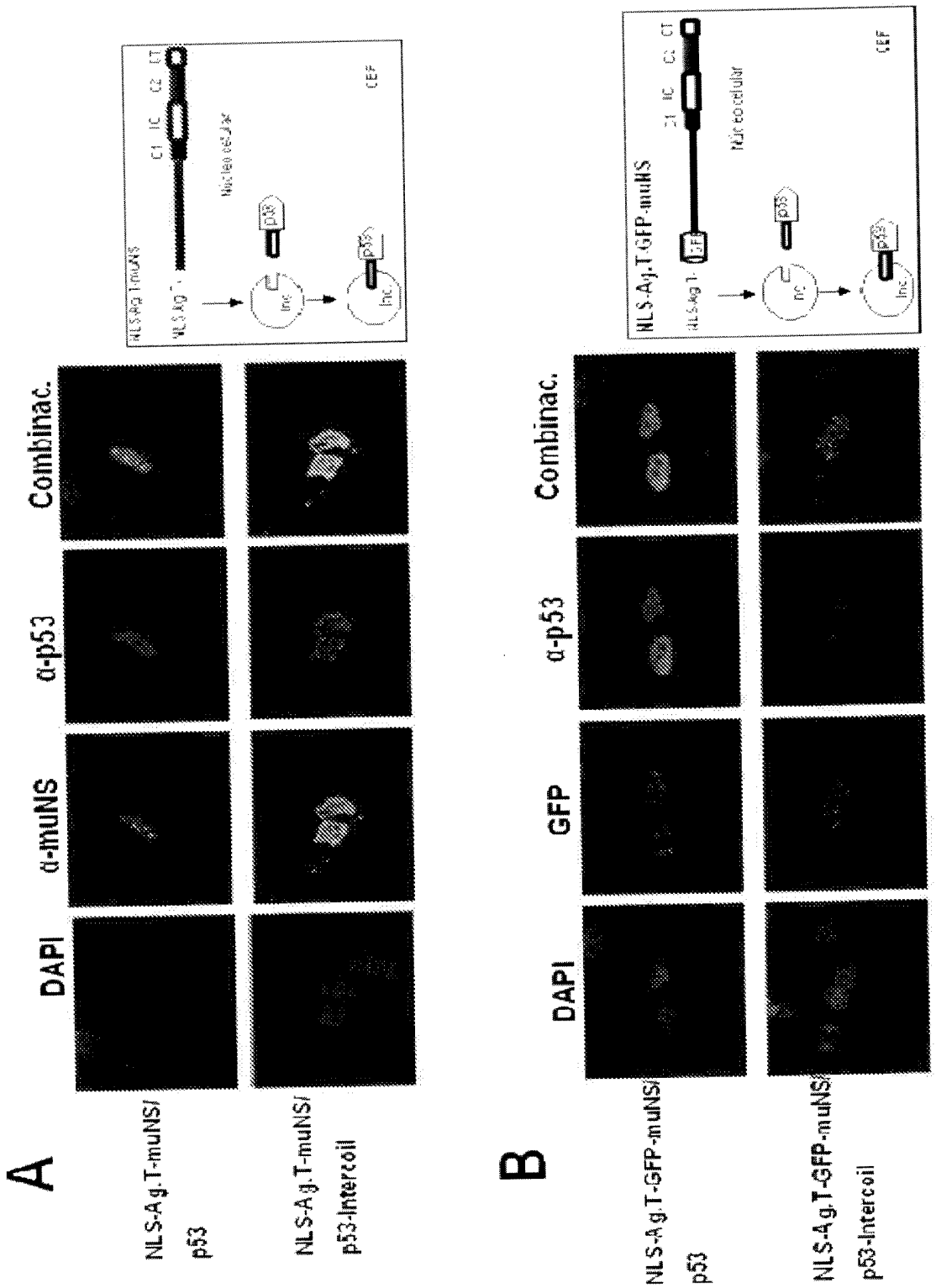

A
DAPI
α-muNS
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS/
p53
NLS-Ag.T-muNS/
p53-Intercoil
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53
NLS-Ag.T-GFP-muNS/
p53-Intercoil

FIG. 30

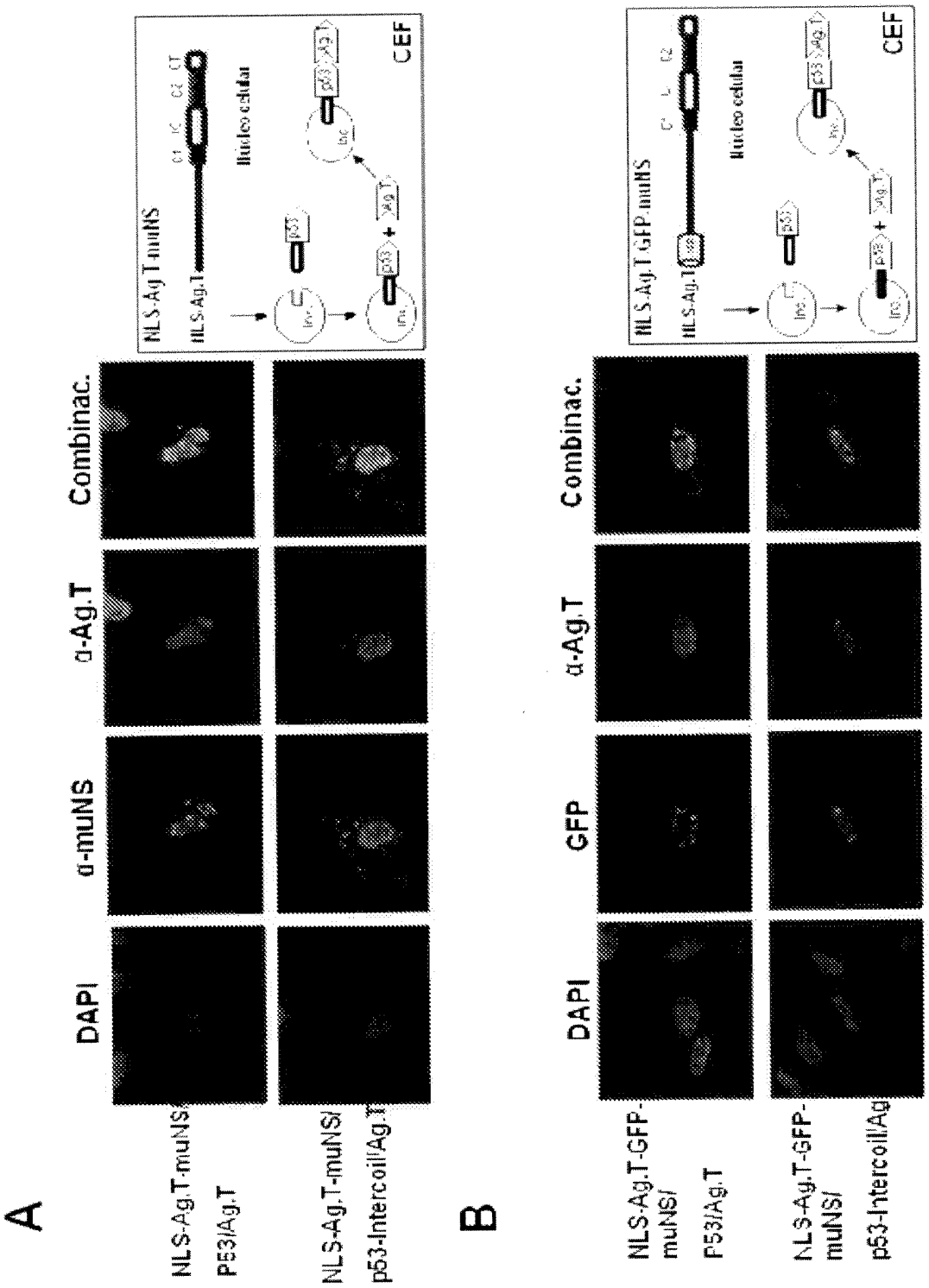

A
DAPI
α-muNS
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-muNS/
P53/Ag.T
NLS-Ag.T-muNS/
p53-Intercoil/Ag.T
NLS-Ag.T-muNS
NLS-Ag.T
C1 IC C2 CT
Núcleo celular
CEF
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-
muNS/
P53/Ag.T
NLS-Ag.T-GFP-
muNS/
p53-Intercoil/Ag
NLS-Ag.T-GFP-muNS
NLS-Ag.T
C1 L C2
Núcleo celular
CEF

FIG. 31

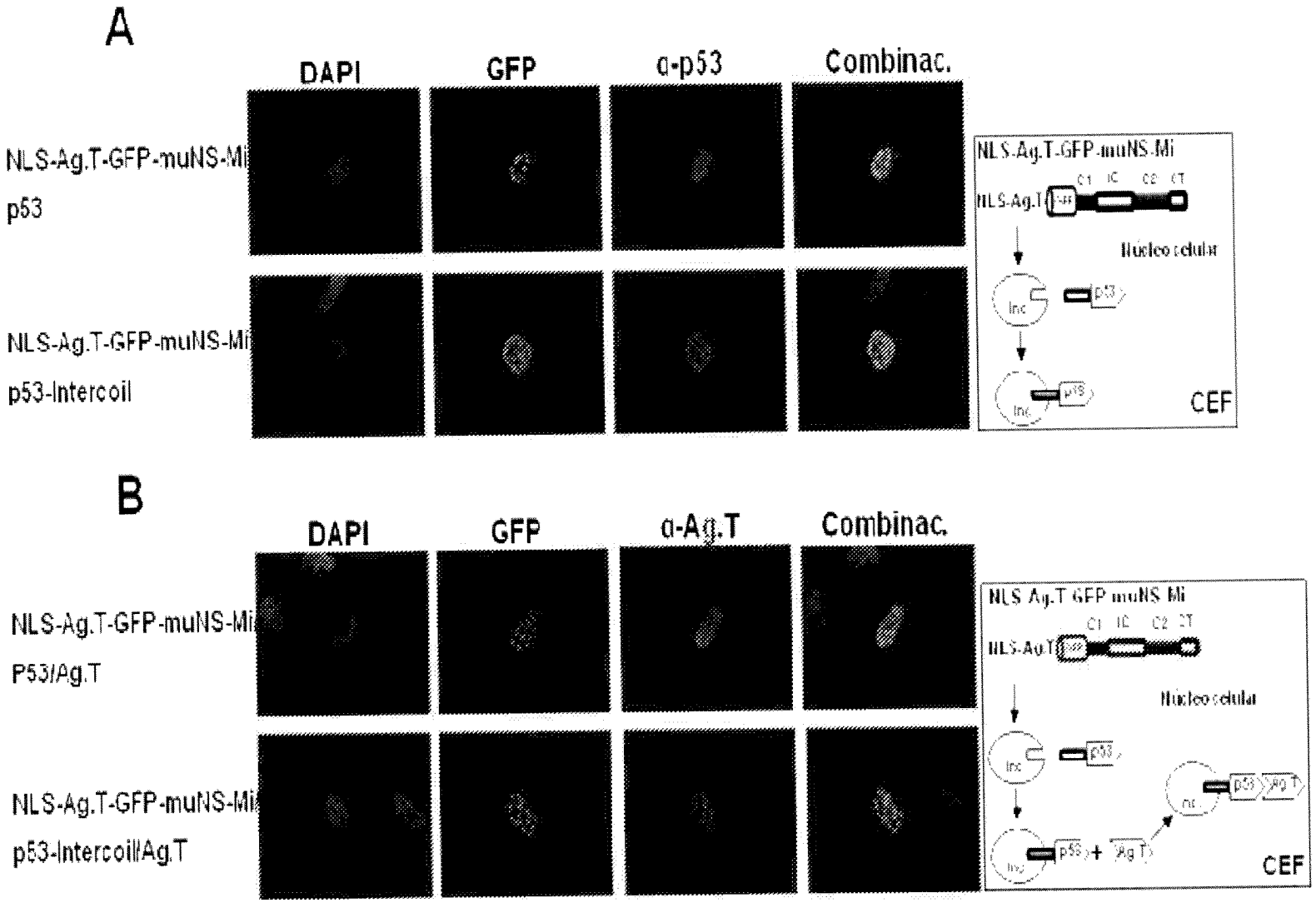

A
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
p53
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
p53-Intercoil
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
Núcleo celular
CEF
B
DAPI
GFP
α-Ag.T
Combinac.
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
P53/Ag.T
NLS-Ag.T-GFP-muNS-Mi
p53-Intercoil/Ag.T
NLS Ag.T GFP muNS Mi
Núcleo celular
CEF

FIG. 32

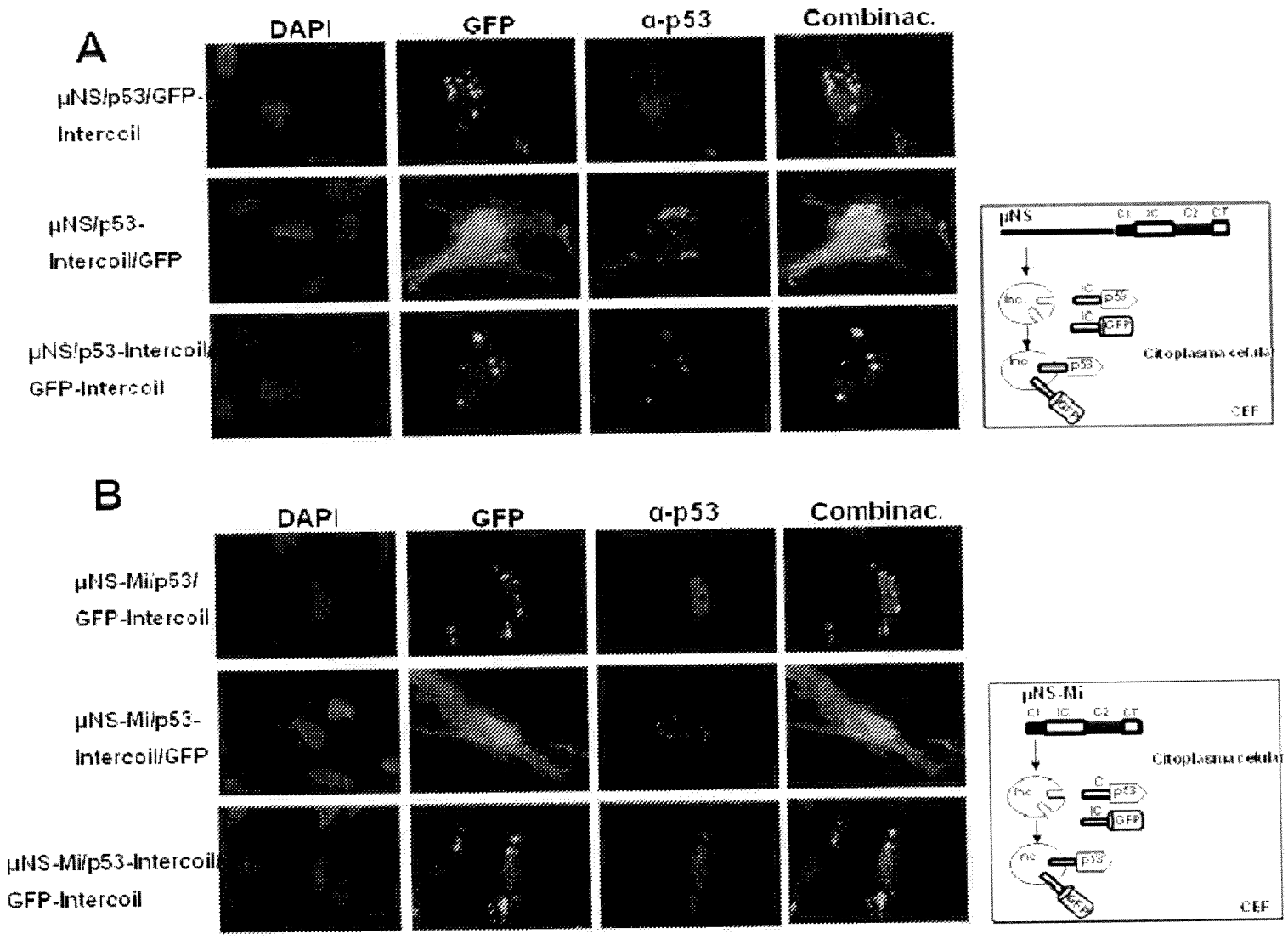

A
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
μNS/p53/GFP-Intercoil
μNS/p53-Intercoil/GFP
μNS/p53-Intercoil/GFP-Intercoil
μNS
C1
IC
C2
CT
p53
GFP
Citoplasma celular
CEF
B
DAPI
GFP
α-p53
Combinac.
μNS-Mi/p53/GFP-Intercoil
μNS-Mi/p53-Intercoil/GFP
μNS-Mi/p53-Intercoil/GFP-Intercoil
μNS-Mi
C1
IC
C2
CT
Citoplasma celular
p53
GFP
CEF

FIG. 33

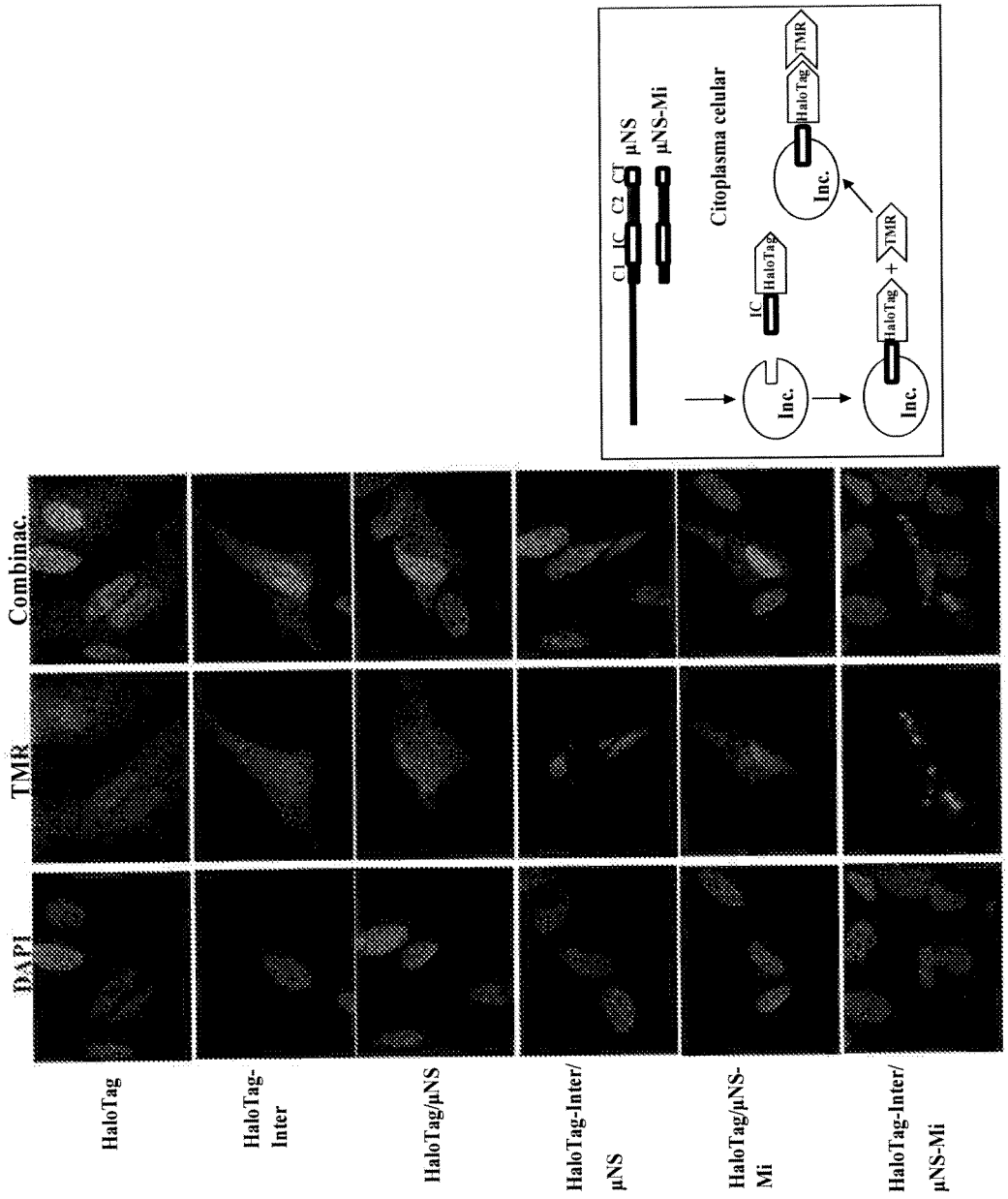

DAPI
TMR
Combinac.
HaloTag
HaloTag-Inter
HaloTag/µNS
HaloTag-Inter/µNS
HaloTag/µNS-Mi
HaloTag-Inter/µNS-Mi
C1
IC
C2
CT
µNS
µNS-Mi
Citoplasma celular
Inc.
IC
HaloTag
HaloTag
+
TMR
HaloTag
TMR

FIG. 34

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Santiago de Compostela

<120> APLICACIONES DE LA PROTEÍNA muNS Y SUS DERIVADOS

<130> P5251ES00

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 188
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 68
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 2

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

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

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

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

Ser Val Gly Pro
65

<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 3

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

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

<210> 4
<211> 66
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 4

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

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

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

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

Glu Ala
65
```

<210> 5
<211> 67
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 5

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

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

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

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

Thr Arg Val
65
```

<210> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 6

```
Val Gly Asp Ala Phe Val Ser Asp Val Glu Pro Leu Pro Ser Gly Ile
1               5                   10                  15

Pro Gly Glu Ser Lys Pro Ser Met Glu Glu Leu Val Asp Asp Leu
            20                  25                  30
```

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (448-635)

<400> 7

```
gcggaattca tcatgccagc cgtactgctg tcta                                    34
```

<210> 8
<211> 33

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (448-635)

<400> 8

gcgtctagat cacagatcat ccaccaattc ttc 33

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar pVP16-muNS

<400> 9

gcggaattca tcatggcgtc aaccaagtgg 30

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar pVP16-muNS

<400> 10

gcgtctagat cacagatcat ccaccaattc ttc 33

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS-NLS AgT

<400> 11

gcgggatccg taccatggtg agcaagggcg ag 32

<210> 12
<211> 33
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS-NLS AgT

<400> 12

gcgtctagat cacagatcat ccaccaattc ttc 33

<210> 13
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar NLS-AgT-muNS

<400> 13

gcggaattca tcatgggacc aaagaagaag cgtaaagtta tcatggcgtc aaccaagtgg 60

<210> 14
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar NLS-AgT-GFP-muNS

<400> 14

gcgggatcca tcatgggacc aaagaagaag cgtaaagtta ccatggtgag caagggcgag 60

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS(1-477)

<400> 15

gcggaattct atcatggcgt caaccaagtg g 31

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS(1-477)

<400> 16

gcgggatcct tattcccgag caggttgaac atc 33

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (1-448)

<400> 17

gcgggatcct tatggaccaa cggacgaatc g 31

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (1-380)

<400> 18

gcgggatcct tatggagacc gtctagcgag aag 33

<210> 19
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (1-154)

<400> 19

gcgggatcct taatcggggg aatcagcggt gg 32

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (448-635)

<400> 20

gcggaattct ccagccgtac tgctgtc 27

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (448-635)

<400> 21

gcgggatcct cacagatcat ccaccaattc ttc 33

<210> 22
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (605-635)

<400> 22

gcggaattct gtcggagacg ccttcgtcag tg 32

<210> 23
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (477-542)

<400> 23

gcggaattct gaagatcact tgttggctta tc 32

<210> 24
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (477-542)

<400> 24

gcgggatcct tacgcttcca cacggggttc ccac 34

<210> 25
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (539-605)

<400> 25

gcggaattct cgtgtggaag cgttaaacca ag 32

<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-muNS (539-605)

<400> 26

gcgggatcct tagacacgtg tcgcacgact catc 34

<210> 27
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (381-448

<400> 27

gcggaattct atgccatcct tcttactcgg tg 32

<210> 28
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-muNS (477-542)

<400> 28

gcggaattct atcgagggaa gggaagatca cttgttggct tatc 44

<210> 29
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (1-154)-HA

<400> 29

gcggaattca tcatggcgtc aaccaagtgg 30

<210> 30
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (1-154)-HA

<400> 30

gcgtctagat tacgcataat ccggcacatc atacggataa tcgggggaat cagcggtgg 59

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (1-380)-HA

<400> 31

gcggaattca tcatggcgtc aaccaagtgg 30

<210> 32
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (1-380)-HA

<400> 32

gcgtctagat tacgcataat ccggcacatc atacggatat ggagaccgtc tagcgagaag 60

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (1-448)-HA

<400> 33

gcggaattca tcatggcgtc aaccaagtgg 30

<210> 34
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (1-448)-HA

<400> 34

gcgtctagat tacgcataat ccggcacatc atacggatat ggaccaacgg acgaatcg 58

<210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (1-477)-HA

<400> 35

gcggaattca tcatggcgtc aaccaagtgg 30

<210> 36
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (1-477)-HA

<400> 36

gcgtctagat tacgcataat ccggcacatc atacggatat tcccgagcag gttgaacatc 60

<210> 37
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (539-635)-HA

<400> 37

gcggaattca tcatggcgcg tgtggaagcg ttaaaccaag 40

<210> 38
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (539-635)-HA

<400> 38

gcgtctagat cacgcataat ccggcacatc atacggatac agatcatcca ccaattcttc 60

<210> 39
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (539-605)-HA

<400> 39

gcggaattca tcatggcgcg tgtggaagcg ttaaaccaag 40

<210> 40
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (539-605)-HA

<400> 40

gcgtctagat cacgcataat ccggcacatc atacggatag acacgtgtcg cacgactcat 60

c 61

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (477-542)-HA

<400> 41

gcggaattca tcatggaaga tcacttgttg gcttatc 37

<210> 42
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (477-542)-HA

<400> 42

gcgtctagat cacgcataat ccggcacatc atacggatac gcttccacac ggggttccca 60

c 61

<210> 43
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (381-448)-HA

<400> 43

gcggaattca tcatgccatc cttcttactc ggtg 34

<210> 44
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para amplificar muNS (381-448)-HA

<400> 44

gcgtctagat cacgcataat ccggcacatc atacggatat ggaccaacgg acgaatcg 58

<210> 45
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar muNS (477-542)

<400> 45

gcgtctagaa tcatggcgga agatcacttg ttggcttatc 40

<210> 46
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar muNS (477-542)

<400> 46

gcggggccct tacgcttcca cacggggttc ccac 34

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar p53

<400> 47

gcgggatcca tcatggagga gccgcagtca gatcc 35

<210> 48
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar p53

<400> 48

gcggaattcg tctgagtcag gcccttctgt cttg 34

<210> 49
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP-Xa-muNS(477-542)

<400> 49

gcgggatcca ccatggtgag caagggcgag 30

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP-Xa-muNS(477-542)

<400> 50

gcgtctagat tacgcttcca cacggggttc ccac 34

<210> 51
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar GFP

<400> 51

gcggaattca ccatggtgag caagggcgag 30

<210> 52
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar GFP

<400> 52

gcgtctagat tacttgtaca gctcgtccat gcc 33

<210> 53
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar HaloTag

<400> 53

gcgggatcca ccatgggctc cgaaatcggt acaggc 36

<210> 54
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar HaloTag

<400> 54

gcataagaat gcggccgcca gccggccagc ccggggag 38

<210> 55
<211> 721
<212> PRT
<213> Reovirus mamífero

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Asp His Arg Gly Pro Gln Gln Leu Asp Val Ser Asp Ala Lys
195 200 205

Gly Ile Met Lys Ala Ala Asp Ile Gln Thr Thr His Asp Val His Leu
210 215 220

Ala Pro Gly Val Gly Asn Ile Asp Pro Glu Ile Tyr Asn Glu Gly Arg
225 230 235 240

Phe Met Phe Met Gln His Lys Pro Leu Ala Ala Asp Gln Ser Tyr Phe
245 250 255

Thr Leu Glu Thr Ala Asp Tyr Phe Lys Ile Tyr Pro Thr Tyr Asp Glu
260 265 270

His Asp Gly Arg Met Ala Asp Gln Lys Gln Ser Gly Leu Ile Leu Cys
275 280 285

Thr Lys Asp Glu Val Leu Ala Glu Gln Thr Ile Phe Lys Leu Asp Ala
290 295 300

Pro Asp Asp Lys Thr Val His Leu Leu Asp Arg Asp Asp Asp His Val
305 310 315 320

Val Ala Arg Phe Thr Lys Val Phe Ile Glu Asp Val Ala Pro Gly His

325 330 335

His Ala Ala Gln Arg Ser Gly Gln Arg Ser Val Leu Asp Asp Leu Tyr
340 345 350

Ala Asn Thr Gln Val Ile Ser Ile Thr Ser Ala Ala Leu Lys Trp Val
355 360 365

Val Lys His Gly Val Ser Asp Gly Ile Val Asn Arg Lys Asn Val Lys
370 375 380

Val Cys Val Gly Phe Asp Pro Leu Tyr Thr Leu Ser Thr His Asn Gly
385 390 395 400

Val Ser Leu Cys Ala Leu Leu Met Asp Glu Lys Leu Ser Val Leu Asn
405 410 415

Ser Ala Cys Arg Met Thr Leu Arg Ser Leu Met Lys Thr Gly Arg Asp
420 425 430

Val Asp Ala His Arg Ala Phe Gln Arg Val Leu Ser Gln Gly Tyr Thr
435 440 445

Ser Leu Met Cys Tyr Tyr His Pro Ser Arg Lys Leu Ala Tyr Gly Glu
450 455 460

Val Leu Phe Leu Glu Arg Ser Asn Asp Val Thr Asp Gly Ile Lys Leu
465 470 475 480

Gln Leu Asp Ala Ser Arg Gln Cys His Glu Cys Pro Val Leu Gln Gln
485 490 495

Lys Val Val Glu Leu Glu Lys Gln Ile Ile Met Gln Lys Ser Ile Gln
500 505 510

Ser Asp Pro Thr Pro Val Ala Leu Gln Pro Leu Leu Ser Gln Leu Arg
515 520 525

Glu Leu Ser Ser Glu Val Thr Arg Leu Gln Met Glu Leu Ser Arg Ala
530 535 540

Gln Ser Leu Asn Ala Gln Leu Glu Ala Asp Val Lys Ser Ala Gln Ser
545 550 555 560

Cys Ser Leu Asp Met Tyr Leu Arg His His Thr Cys Ile Asn Gly His
565 570 575

Ala Lys Glu Asp Glu Leu Leu Asp Ala Val Arg Val Ala Pro Asp Val
580 585 590

Arg Arg Glu Ile Met Glu Lys Arg Ser Glu Val Arg Gln Gly Trp Cys
595 600 605

Glu Arg Ile Ser Lys Glu Ala Ala Ala Lys Cys Gln Thr Val Ile Asp
610 615 620

Asp Leu Thr Leu Met Asn Gly Lys Gln Ala Gln Glu Ile Thr Glu Leu
625 630 635 640

Arg Asp Ser Ala Glu Lys Tyr Glu Lys Gln Ile Ala Glu Leu Val Ser
645 650 655

Thr Ile Thr Gln Asn Gln Ile Thr Tyr Gln Gln Glu Leu Gln Ala Leu
660 665 670

Val Ala Lys Asn Val Glu Leu Asp Ala Leu Asn Gln Arg Gln Ala Lys
675 680 685

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

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

Leu

<210> 56
<211> 635
<212> PRT
<213> Reovirus aviar

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Ala Leu Pro Ala Leu Ala Gln Tyr Leu Met Val Gly Thr Leu
130 135 140

Glu Ala Val Ser Thr Ala Asp Ser Pro Asp Ala Cys Val Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Leu Asp Glu Glu Glu Tyr Asn Val Ile Arg Ser Arg Phe Leu Thr His
180 185 190

Glu Val Phe Asp Leu Thr Ser Asp Leu Pro Gly Val Gln Pro Phe Met
195 200 205

Asp Met Tyr Tyr Ala Thr Val Pro Arg Ala Asp Ser Thr Gly Trp Cys
210 215 220

Val Tyr Arg Arg Lys Gly Leu Leu Ile His Ala Pro Asp Glu Gln Phe
225 230 235 240

Ser Asp Leu Thr Ile Phe Ser Thr Arg Leu Thr Ala Ser Arg Glu Leu
245 250 255

Gln Leu Val Ala Gly Asp Val Ala Val Ala Cys Phe Asp Leu Met Asp
260 265 270

Val Ser Asp Ile Ala Pro Ser His His Ala Ser Val Gln Glu Glu Arg
275 280 285

Thr Leu Gly Thr Ser Arg Tyr Ser Asn Val Thr Ala Asn Asp His Pro
290 295 300

Leu Val Phe Phe Ser Pro Ser Ala Leu Arg Trp Ala Ile Asp His Ala
305 310 315 320

Cys Thr Asp Ser Leu Val Ser Thr Arg Asn Ile Arg Val Cys Val Gly
325 330 335

Ile Asp Pro Leu Val Thr Arg Trp Thr Arg Asp Gly Val Gln Glu Ala
340 345 350

Ala Ile Leu Met Asp Asp Lys Leu Pro Ser Ala Gly Arg Ala Arg Met
355 360 365

Ala Leu Arg Thr Leu Leu Leu Ala Arg Arg Ser Pro Met Thr Ser Phe
370 375 380

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gly Leu Leu Ser Arg Cys Asn Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser

500 505 510

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS del Antígeno T de SV40

<400> 57

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 58

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de nucleoplasmina

<400> 58

```
Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
1               5                   10                  15
```

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS similar al homeodominio de la proteína MATa2 de *S. cerevisiae*

<400> 59

```
Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
1               5
```

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS similar al homeodominio de la proteína c-myc

<400> 60

```
Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe
1               5                   10
```

<210> 61
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína M9 de hRNPA1

<400> 61

Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
20 25 30

Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
35

<210> 62
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS del dominio IBB de la importina alfa

<400> 62

Arg Met Arg Lys Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu Arg
1 5 10 15

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

Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
35 40

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína T de mioma

<400> 63

Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína T de mioma

<400> 64

```
Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
1               5
```

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína c-abl IV de ratón

<400> 65

```
Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
1               5                   10
```

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína NS1 del virus de la gripe

<400> 66

```
Asp Arg Leu Arg Arg
1               5
```

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína NS1 del virus de la gripe

<400> 67

```
Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys
1               5
```

<210> 68
<211> 10

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS del antígeno delta del virus de hepatitis

<400> 68

```
Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu
1               5                   10
```

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína Mx1 de ratón

<400> 69

```
Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg
1               5                   10
```

<210> 70
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la poli (ADP-ribosa) polimerasa

<400> 70

```
Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys
1               5                   10                  15

Lys Ser Lys Lys
                20
```

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de los receptores de hormonas esteroideas humanos

<400> 71

Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NLS de la proteína pl7 del reovirus aviar

<400> 72

Ile Ala Ala Lys Arg Gly Arg Gln Leu Asp
1 5 10

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de la enteroquinasa

<400> 73

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 74

Ile Glu Asp Gly Arg
1 5

<210> 75

<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de trombina

<400> 75

```
Leu Val Pro Arg Gly Ser
1               5
```

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 76

```
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1               5
```

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sitio de corte de proteasa PreScission
<400> 77

```
Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1               5
```

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201030204

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 12.02.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	BROERING TJ et al. Carboxyl-Proximal Regions of Reovirus Nonstructural Protein _NS Necessary and Sufficient for Forming Factory-Like Inclusions. Journal of Virology. Mayo 2005, Vol. 79(10), páginas: 6194-6206, todo el documento.	1-3,5
A		4,6-19
Y	TOURIS-OTERO F et al. Avian Reovirus Morphogenesis Occurs Within Viral Factories and Begins with the Selective Recruitment of sNS and lA to mNS Inclusions. Journal of Molecular Biology. 2004, Vol. 341, páginas: 361-374, todo el documento.	1-3,5
A	MILLER, CL et al. Localization of Mammalian Orthoreovirus Proteins to Cytoplasmic Factory-Like Structures via Nonoverlapping Regions of _NS. Journal of Virology. Enero 2010, Vol. 84(2), páginas: 867-882, página 867, resumen.	1-19
A	BROERING TJ et al. Mammalian Reovirus Nonstructural Protein _NS Forms Large Inclusions and Colocalizes with Reovirus Microtubule-Associated Protein _2 in Transfected Cells. Journal of Virology. Agosto 2002, Vol. 76(16), páginas: 8385-8297, página 8385, resumen.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
04.07.2011	M. García Grávalos	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/46 (2006.01)
C07K14/14 (2006.01)
G01N33/68 (2006.01)
G01N33/569 (2006.01)
A61K35/76 (2006.01)
A61K38/00 (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

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

C07K, C12N, G01N, A61P

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-19	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	4, 6-19	**SI**
	Reivindicaciones	1-3, 5	**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BROERING TJ et al. Journal of Virology. Mayo 2005, Vol. 79(10), páginas: 6194-6206.	Mayo 2005
D02	TOURIS-OTERO F et al. Journal of Molecular Biology. 2004, Vol. 341, páginas: 361-374.	2004
D03	MILLER, CL et al. Journal of Virology. Enero 2010, Vol. 84(2), páginas: 867-882.	Enero 2010
D04	BROERING TJ et al. Journal of Virology. Agosto 2002, Vol. 76(16), páginas: 8385-8297.	Agosto 2002

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

La presente invención divulga un polipéptido, que contiene los aminoácidos 381 a 635 de la proteína muNS, de Orthoreovirus aviar, que es capaz de formar inclusiones en una célula (reivindicaciones 1-3), y una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés fusionado a otro polipéptido que incluye, de forma alternativa, una de las cuatro secuencias de la invención identificadas como SEQ ID NO:2-5 (reivindicaciones 4-7). Se refiere también a un kit con ambos péptidos (reivindicaciones 8-9) y a métodos para purificación de polipéptidos recombinantes e inclusiones, así como métodos de detección de la interacción entre dos polipéptidos de interés y a su uso para preparación de un medicamento para estimulación de la respuesta inmune (reivindicaciones 10-19).

El documento D01 divulga las regiones de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero que son capaces de formar inclusiones citoplasmáticas, tipo factorías virales, en una célula transfectada, en ausencia de infección o de otras proteínas virales. En particular, se refiere al segmento entre los residuos 471-721 como la región más pequeña de muNS necesaria y suficiente para formar inclusiones, y a otras secuencias comprendidas en este segmento que son requeridas para formarlas, además de considerar estas inclusiones de utilidad para aislamiento de péptidos de interés y para estudios de interacción entre péptidos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un estudio realizado con la proteína muNS, de Orthoreovirus aviar, sobre la formación de inclusiones, tipo factorías virales, cuando se expresa en células transfectadas, teniendo un papel importante en el reclutamiento de proteínas de este reovirus aviar (ver todo el documento).

El documento D03 divulga la región de la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero necesaria y suficiente para formar inclusiones, tipo factorías virales, y asociaciones con otras proteínas estructurales virales, al tiempo que se localiza la síntesis de ARN viral en células infectadas, encontrando que fragmentos cortos, entre los últimos 220 aminoácidos de la región terminal, son necesarios y suficientes para la asociación con partículas estructurales y otra proteínas (ver página 867, resumen).

El documento D04 se refiere a un estudio sobre la formación de inclusiones, tipo factorías virales, por la proteína muNS de Orthoreovirus mamífero, cuando se expresa en células transfectadas (ver página 8285, resumen).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1-19

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa la región más pequeña de la proteína muNS de Orthoreovirus necesaria y suficiente para formar inclusiones, tipo factorías virales, en una célula transfectada. Anticipa también el uso de estas inclusiones para aislamiento de péptidos de interés y para estudios de interacción entre péptidos. Sin embargo, este documento se refiere a Orthoreovirus mamífero, en lugar de aviar, y el fragmento indicado no coincide con las secuencias reivindicadas en la presente invención.

La diferencia entre el documento D01 y la presente invención radica en la identificación de la región mínima, que es capaz de formar inclusiones, en Orthoreovirus aviar y en la determinación de dominios de esta proteína capaces de incorporarse a las inclusiones citoplasmáticas. Además, se describen métodos de purificación de proteínas y de detección de interacción entre polipéptidos.

Según lo divulgado en D01, las reivindicaciones 1-19 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-19

La reivindicación 1, se refiere a un polipéptido, que contenga los aminoácidos 381-635 (SEQ ID NO:1) de de la proteína MuNS de Orthoreovirus aviar, que no sea dicha proteína. El documento D02 anticipa esta proteína, su función en la formación de inclusiones virales y los números de acceso de “GenBank”, donde se encuentra la secuencia de aminoácidos que la forma y la de nucleótidos que la codifica. Por tanto, se considera que sería obvio para un experto en la materia el obtener cualquier secuencia de aminoácidos, relacionada con la proteína muNS de Orthoreovirus aviar, que contenga los aminoácidos 381-635 de esta proteína.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-3 y 5 carecen de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 4, 6-19, cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.