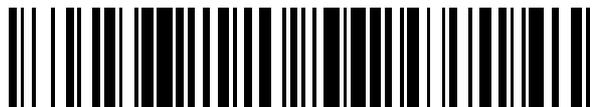


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 456 823**

21 Número de solicitud: 201231466

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

21.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2014

Fecha de la concesión:

20.01.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.01.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070653

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (45.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA
(45.0%) y
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA (10.0%)**

72 Inventor/es:

**ORZAEZ CALATAYUD, Diego Vicente;
JULVE PARREÑO, Jose Manuel;
GRANELL RICHART, Antonio;
SARRION-PERDIGONES, Alejandro y
GUTIERREZ CABRERA, Carlos**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE REPERTORIOS COMPLEJOS DE MOLÉCULAS
RECOMBINANTES**

57 Resumen:

La presente invención describe un método de producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes de forma consistente y reproducible, mediante la generación de forma transitoria de plantas multi-transgénicas que dan lugar a mosaicos somáticos inducidos por replicones virales que se excluyen entre sí. La presente invención también hace referencia a la planta multi-transgénica o un fragmento de la misma así obtenida, así como a los extractos o fracciones purificadas de las mismas que representen repertorios complejos de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes seleccionadas entre: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, lectinas, anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

ES 2 456 823 B1

DESCRIPCIÓN

Método de producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes.

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra dentro de la tecnología "biotecnología agrícola", siendo aplicable en la producción de conjuntos de moléculas recombinantes en los sectores químico, farmacéutico, veterinario y agrícola.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

En la actualidad existe una demanda creciente de moléculas recombinantes, para su uso en distintos sectores como el farmacéutico, veterinario, energético, etc. Muchas de estas proteínas requieren de sistemas eucariotas para su producción. En la mayoría de los casos, el objetivo último de la técnica es la producción de una única proteína de composición homogénea, como por ejemplo un factor de crecimiento o un anticuerpo monoclonal, y por ello la mayoría de los sistemas actuales están adaptados a este fin. Sin embargo no se dispone de metodologías que permitan producir repertorios complejos de proteínas diferentes de manera tal que la composición final de la mezcla sea altamente reproducible.

Algunos ejemplos de conjuntos complejos de proteínas que la industria produce y/o utiliza son los anticuerpos policlonales, las inmunoglobulinas hiperinmunes, los sueros inmunológicos para inmunidad pasiva o los antivenenos basados en antisueros. En todos los casos citados, el conjunto comprende, en todo o en parte, el repertorio de secuencias aminoacídicas que conforma la respuesta inmune de uno o varios individuos. La respuesta inmune de los mamíferos basa gran parte de su eficacia en el hecho de que comprende un amplio repertorio (policlonal) de inmunoglobulinas (anticuerpos) distintas. De esta forma diferentes inmunoglobulinas reconocen diferentes regiones del patógeno/antígeno/toxina garantizando una mayor adaptabilidad y capacidad de neutralización. Análogamente, los anticuerpos policlonales resultan más eficaces que los monoclonales en gran cantidad de aplicaciones terapéuticas, como la neutralización de toxinas y agentes infecciosos, o de diagnóstico como la detección de especímenes de composición poco definida (Bregenholt et al., 2006; Dunman and Nesin, 2003; Haurum, 2006; Koefoed et al., 2006; Sharon et al., 2000).

A pesar de las ventajas inherentes a la policlonalidad, la producción de repertorios complejos de proteínas de forma recombinante ha sido poco abordada debido a su complejidad técnica. Prueba de ello es que en la actualidad los anticuerpos recombinantes comerciales son monoclonales. En aquellas aplicaciones donde es necesario el uso de repertorios complejos, como en el caso de anticuerpos policlonales para diagnóstico, los antivenenos basados en antisueros, las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias o las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva, se recurre a producirlos de forma tradicional (no recombinante), mediante inmunización y posterior aislamiento y purificación de sueros policlonales en animales (ratón, conejo, cabra o caballo, entre otros) o humanos.

Los anticuerpos policlonales, los antivenenos basados en antisueros y otros productos inmunológicos para inmunidad pasiva obtenidos a partir de animales inmunizados presentan los siguientes problemas: (i) plantean problemas éticos en su manufactura; (ii) tienen alta variabilidad entre lotes, debido a las diferencias de respuesta inmunológica de distintos individuos (iii) requieren una exhaustiva caracterización *de novo* en cada lote (iv) presentan riesgos de inmunogenicidad y transmisión inadvertida de patógenos cuando su uso es terapéutico.

Por su parte las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias y las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva se obtienen a partir de plasma sanguíneo de donantes humanos y su suministro es limitado. No existe alternativa recombinante en la actualidad.

Los problemas que presenta la obtención/producción/utilización de anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva obtenidos a partir de animales inmunizados, o las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias y las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva que se obtienen a partir de plasma sanguíneo de donantes humanos, se podrían solventar mediante la producción recombinante de repertorios complejos de anticuerpos policlonales. Sin embargo, existen numerosos problemas técnicos que limitan esta posibilidad. Se han desarrollado algunas estrategias en este sentido basadas en animales transgénicos. Tal es el caso de los ratones transgénicos a los que se les ha introducido los loci de inmunoglobulinas humanas (US 6,111,166), los cuales pueden producir anticuerpos policlonales humanos mediante técnicas convencionales de inmunización. Sin embargo este sistema produce cantidades mínimas de anticuerpos debido al pequeño tamaño de los animales. También se han obtenido animales transgénicos de mayor tamaño como vacas (Kuroiwa et al., 2002).

Sin embargo los animales transgénicos tienen ciertos inconvenientes. En primer lugar, la inestabilidad de los loci

de inmunoglobulinas compromete a largo plazo la producción de anticuerpos. En segundo lugar, es difícil eliminar las inmunoglobulinas del propio animal. En tercer lugar, los animales transgénicos no están exentos del riesgo de transmisión inadvertida de patógenos. Por último, la composición de la mezcla no es enteramente reproducible pues dependerá de las condiciones inmunofisiológicas del animal.

Una alternativa a los animales transgénicos consiste en producir anticuerpos policlonales recombinantes a partir de secuencias variables de inmunoglobulinas obtenidas de individuos con una respuesta inmune establecida, utilizando células de mamífero como plataforma de producción. Esta tecnología utiliza líneas celulares de mamíferos adaptadas para conseguir una integración sitio-específica de cada uno de los transgenes que constituyen la muestra (Bregenholt et al., 2006; Haurum, 2006; Klitgaard et al., 2006; Koefoed et al., 2011; Koefoed et al., 2006; Pedersen et al., 2010; Wiberg et al., 2006). Esto elimina la variabilidad de expresión debida al efecto posicional del transgén y facilita la producción de mezclas reproducibles de anticuerpos policlonales con alta consistencia lote a lote a escala industrial (WO 2004/061104).

Más recientemente se ha desarrollado un protocolo que mediante selección individual de clones estables de células de mamífero transformadas mediante inserciones al azar permite producir mezclas policlonales con reproducibilidad lote a lote (WO 2008/145133). Sin embargo, estas metodologías requieren un proceso laborioso de selección de clones individuales estables, por lo que es poco adecuada para mezclas policlonales de alta complejidad. Además los sistemas basados en células de mamífero tienen altos costes de inversión, producción, y escalado industrial, lo que hace atractivo el uso de plataformas alternativas que reduzcan los costes.

Un grupo de plataformas alternativas particularmente interesante son aquellas basadas en plantas. Las plantas se utilizan como biofactorías de proteínas de muy distinta índole utilizando para ello, entre otras metodologías, virus recombinantes (Orzaez et al., 2009). Existen numerosos ejemplos de virus vegetales que han sido adaptados a la producción de proteínas recombinantes en plantas (Gleba et al., 2004). Para ello el virus silvestre se somete a una serie de modificaciones tendentes a convertirlo en un vector viral, esto es, un ácido nucleico, generalmente de naturaleza plasmídica capaz de transferir a la célula unidades autoreplicativas que albergan la secuencia que codifica la proteína de interés. Una de las principales ventajas del uso de vectores virales es que su capacidad autoreplicativa permite amplificar el número de copias del transgen en la célula, lo que favorece la obtención de altísimos niveles de producción recombinante. En la actualidad existen numerosos vectores virales siendo explotados por laboratorios académicos y empresas biotecnológicas (por ejemplo WO 05/049839, WO 06/079546).

Hasta el momento, los vectores virales se han utilizado para la producción de productos homogéneos, como anticuerpos monoclonales, algunos de los cuales se encuentran en fases de ensayos clínicos. Un precedente en el intento de avanzar hacia la producción de mezclas policlonales de anticuerpos basándose en sistemas virales de plantas aparece en un trabajo desarrollado por Julve et al., 2011 (resumen de tesis de Máster, Universidad Politécnica de Valencia). En concreto, se hace referencia a la producción de una mezcla policlonal de Nanobodies (VHHs) usando hojas de *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo la metodología resumida en Julve et al., 2011 es muy laboriosa ya que se basa en la expresión individualizada de cada anticuerpo en hojas distintas e independientes y su posterior mezcla y purificación conjunta dando lugar a una mezcla policlonal final. Por tanto, se trata de una estrategia basada en plantas mono-transgénicas que se mezclan posteriormente. La aproximación de Julve et al., 2011 no aporta procedimiento alguno para producir mezclas de proteínas recombinantes de complejidad alta o muy alta, ya que estas son inaccesibles a un método que no implique expresión simultánea.

Llevado de este único precedente, hasta la fecha no se han utilizado vectores virales para la producción simultánea de mezclas complejas de proteínas recombinantes, entre otras razones porque se considera que, según el modelo comúnmente aceptado de cuasiespecies, la competencia que tiene lugar entre los distintos clones que co-infectan una planta conduce al predominio de unos pocos clones sobre los demás. Es esperable por tanto que la mezcla resultante tenga una composición singular y no reproducible, puesto que el concepto de "competencia entre clones" conduce al dominio de unas variantes sobre otras y por tanto a una escasísima reproducibilidad entre experimentos. El requerimiento de reproducibilidad sería muy ventajoso, ya que permitiría producir mezclas terapéuticas con composición constante lote a lote.

Por tanto, actualmente existe la necesidad de desarrollar un método para la producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes, basado en plantas y tejidos que cumplan los requisitos de "multi-trangénesis" (co-expresión de los distintos transgenes simultáneamente en forma de mosaico somático en un mismo tejido) y de reproducibilidad del sistema de expresión (producción de mezclas altamente reproducibles entre experimentos independientes).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método para la obtención de mezclas policlonales de moléculas recombinantes, de forma consistente y reproducible, mediante la generación de forma transitoria de plantas

multi-transgénicas que dan lugar a mosaicos somáticos inducidos por replicones virales que se excluyen entre sí.

Las plataformas eucariotas actuales no ofrecen la posibilidad de producir repertorios complejos de proteínas, ya que están basadas en su mayoría en la introducción en el organismo recombinante de un único gen (o a lo sumo un grupo reducido de genes en el caso de proteína oligoméricas). La producción de mezclas policlonales presenta dificultades técnicas, que son distintas según el tipo de plataforma utilizada.

(i) En el caso de organismos completos, como animales o plantas transgénicas, el problema técnico consiste en la dificultad de transformar el genoma de forma estable con un número alto de secuencias similares. A esto hay que añadir la dificultad de controlar los niveles de expresión de cada gen individual integrado en el genoma, lo que dificulta la obtención de una mezcla definida.

(ii) En el caso de cultivos celulares, la competencia entre clones durante la fase de crecimiento del cultivo conduce a la pérdida de diversidad y por tanto a una escasa reproducibilidad. Una alternativa para obtener mezclas de composición definida consiste en producir de forma separada los diferentes componentes de manera individualizada y realizar la mezcla *a posteriori*. Esto implica mantener líneas paralelas de producción y purificación, lo cual supone un coste creciente que resulta inviable cuando la complejidad de la mezcla alcanza un cierto umbral.

La presente invención está basada en un aspecto poco estudiado de la infección viral en plantas: la alta estructuración espacial de las variantes clonales producidas durante el curso de la infección (Elena et al., 2011; Sardanyes and Elena, 2011). Esta distribución espacial ocurre como consecuencia de la propia estructura anatómica de las plantas y está facilitada por un fenómeno conocido como “exclusión de la superinfección” o “interferencia homóloga”. Este fenómeno consiste en que la presencia de un clon viral “residente” en una célula o grupo de células impide la superinfección de las mismas por un segundo clon viral “retador” altamente relacionado con el primero (Folimonova, 2012; Syller, 2012; Ziebell and Carr, 2010). Este fenómeno resulta especialmente evidente al infectar experimentalmente una planta con una mezcla compleja de variantes víricas. En este caso, las distintas variantes no entran en competencia entre todas ellas como cabría esperar, lo que daría lugar a una distribución homogénea liderada por el clon más apto. Por el contrario, cada variante coloniza una región de la planta excluyendo a las demás y dando lugar a una distribución espacial estructurada en mosaico que permite la convivencia en diferentes células de la misma planta de las diferentes variantes clonales.

Esta invención describe el aprovechamiento del fenómeno natural de “exclusión de la superinfección” o “interferencia homóloga” viral para la producción de conjuntos espacialmente delimitados de proteínas (mosaicos somáticos) que pueden dar lugar a mezclas policlonales de productos recombinantes de composición definida, reproducible y con altos rendimientos.

La invención hace uso de vectores virales derivados de un virus vegetal. Hasta ahora, la principal ventaja que confieren los vectores virales es que permiten alcanzar altos rendimientos de proteína recombinante. Esto es debido a su capacidad de auto-replicación, que conlleva a su vez la amplificación del gen que codifica la proteína recombinante a producir. Existen multitud de vectores virales descritos en la literatura del campo que se adaptan a esta descripción y que por tanto son utilizables para desarrollar el método de la invención. Dicho vector viral puede estar formado bien por un genoma viral completo o bien por un genoma viral del que se han eliminado partes superfluas, pero que conserva las funciones básicas del virus silvestre, y como mínimo la función de autoreplicación, la función de movimiento célula a célula y la capacidad de ejercer “interferencia homóloga” entre clones relacionados. Dicho vector viral ha de ser capaz además de incorporar de forma recombinante una secuencia de nucleótidos que codifique el o los genes de interés y de inducir su traducción a proteína en la célula huésped. Con la presente invención esa propiedad de interferencia homóloga cobra tanta importancia como los altos niveles de producción.

En la presente invención, la producción de una mezcla formada por un número N de proteínas recombinantes distintas se realiza clonando en primer lugar los N genes que codifican las N proteínas de interés en una misma posición dentro del vector viral. El clonaje puede realizarse clon a clon de forma separada, o bien realizarse de forma conjunta en una sola reacción de clonación en el que se incluyen en una misma solución todas las variantes de genes de interés. Una vez generadas las N variantes clonales del vector viral, estas se transfieren de forma conjunta y simultánea a la planta huésped utilizando alguna de los distintas metodologías de transferencia de vectores virales accesibles en el estado del arte, en una dilución tal que se favorezca la entrada de un número medio entre cero y uno de entidades replicativas por célula huésped.

En una realización preferida pero no limitante de la presente invención, la transferencia de las N variantes clonales del vector viral a las células de la planta se realiza mediante transformación genética transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de un clon infectivo del virus, generando así una planta transitoriamente multi-transgénica. En estas circunstancias, en cada célula del huésped se replica mayoritariamente una o ninguna de las variantes clonales del vector viral. Como consecuencia de la función de movimiento célula a célula, y eventualmente de la función de movimiento sistémico del replicón viral, cada clon viral se desplaza desde la

célula infectada inicialmente a células adyacentes y/o distantes que no hayan resultado a su vez infectadas primariamente por otro clon viral, amplificando allí su genoma y acumulando el producto del gen recombinante. Sin embargo, en virtud de la función de interferencia homóloga, cada clon viral queda excluido de aquellas células en las que exista una infección ya establecida por otro clon residente. Como consecuencia se obtiene una distribución estructurada en mosaico de los diferentes clones virales donde la abundancia relativa de cada clon está en función, entre otros parámetros, de su capacidad de trasladarse de célula a célula. La interferencia homóloga provoca una distribución estructurada en mosaico de la variabilidad clonal que minimiza el efecto de competencia entre clones. Transcurrido el tiempo necesario para que se desarrolle un mosaico estable, se procede a la homogenización de la planta y a llevar a cabo los procesos de extracción y/o purificación convenientes en función de la naturaleza de las proteínas a producir, obteniéndose como resultado una mezcla compleja de proteínas recombinantes cuya composición es consistente y reproducible entre experimentos.

La población de proteínas recombinantes producidas cambia durante las primeras etapas de infección, pero dado un tiempo de incubación suficientemente largo para que se hayan colonizado todas las células de la planta, la abundancia relativa de cada proteína en la mezcla (C_i) está en función de los siguientes parámetros: (V_i) la velocidad de movimiento célula a célula de cada clon; (P_i) los niveles de producción de proteína específicos de cada clon; (ODR_i) la abundancia relativa de cada clon en el inoculo inicial.

En principio, la co-existencia de dos o más clones en la misma célula hace necesario incluir un cuarto factor (lij) que refleja en su caso el resultado de la interacción entre dos clones i y j cuando estos compiten por los recursos biosintéticos de la misma célula. lij es un parámetro complejo, diferente para cada par ij . La complejidad del parámetro lij hace que C_i resulte altamente variable e impredecible en sistemas sin interferencia homóloga. Sin embargo, en la metodología descrita en esta invención, la existencia de un fenómeno de interferencia homóloga disminuye al mínimo la interacción entre clones, permitiendo despreciar el parámetro lij y por tanto facilitando la predictibilidad y reproducibilidad de la expresión de mezclas policlonales.

Por tanto el sistema descrito permite la producción de mezclas de complejidad alta o muy alta e incluso de mezclas de composición indefinida con altos rendimientos. El límite teórico de componentes distintos que puede comprender dicha mezcla es del mismo orden que número total de células empleadas en el proceso de producción. Dado que la metodología es escalable simplemente aumentando el número de plantas, la complejidad potencial de la mezcla es virtualmente ilimitada. Alternativamente, esta metodología puede utilizarse para la producción de una mezcla policlonal definida que comprenda N clones previamente seleccionados.

El requerimiento de reproducibilidad es muy ventajoso, ya que permitiría producir mezclas terapéuticas con composición constante lote a lote. El procedimiento de la invención da lugar a mezclas cuya composición es altamente reproducible entre experimentos. La alta reproducibilidad de la expresión multitransgénica del procedimiento de la invención, se demuestra en los ejemplos, donde se describen experimentos en los que se ensayan mezclas de complejidad muy alta (>100 elementos). Se apunta que la posible razón de esta reproducibilidad es la puesta en acción de un fenómeno de interferencia homóloga, aunque este criterio es diferente al descrito en el estado de la técnica (actualmente no se ha establecido la conexión entre los fenómenos de interferencia homóloga y reproducibilidad) y por tanto constituye una alternativa válida a los métodos previos de producción de mezclas complejas de proteínas recombinantes.

Además de la citada reproducibilidad, el método de la invención tiene una aplicación importante en la producción de complejos multiprotéicos policlonales, ya que la interferencia homóloga impide la formación de complejos multiprotéicos distintos a los deseados. Así, cuando los clones a expresar forman homopolímeros, como homodímeros o homotetrámeros, la co-expresión de dos o más clones en una misma célula mediante los métodos tradicionales conduce a la formación de una mezcla inconsistente de heteropolímeros. En cambio el procedimiento de la invención favorece la formación preferente de homodímeros. Igualmente, el método de la invención facilita la expresión policlonal de mezclas de heteropolímeros de composición definida, como es el caso de los anticuerpos policlonales.

En este caso particular, cada cadena pesada tiene una cadena ligera acompañante. Al expresar mezclas policlonales en sistemas sin interferencia homóloga tiene lugar un fenómeno conocido como "barajado de cadenas", por el cual cada cadena pesada se puede unir con cualquier cadena ligera distinta de su acompañante, dando lugar a un anticuerpo de actividad subóptima. El método de la invención permite minimizar el efecto de barajado de cadenas al minimizar la interferencia entre clones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un método para la producción de al menos un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por comprender los siguientes pasos:

- i) ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas en un vector viral de destino derivado de un virus vegetal que en su mecanismo de infección presenta la propiedad conocida como "interferencia

homóloga” o “exclusión de la superinfección”, de forma tal que se genere una colección de clones virales;

5 ii) transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped o un órgano o tejido de una planta huésped que es susceptible de albergar la replicación y el movimiento del vector viral.

10 iii) generación de una planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático donde más del 80%, preferentemente más del 90%, de las células expresan exclusivamente una de las N moléculas recombinantes, o bien la expresan muy mayoritariamente, en una proporción molar que supone al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, del total de N moléculas recombinantes producidas en esa misma célula.

15 En una realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes. En este caso, el paso i) se caracteriza por ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas que corresponden a las secuencias codificantes de cada una de las N proteínas distintas que se quieren producir en formato policlonal, en un vector viral de destino derivado de un virus vegetal que en su mecanismo de infección presenta la propiedad conocida como “interferencia homóloga” o “exclusión de la superinfección”, de forma tal que permita su traducción a proteínas, formándose una colección de clones virales. Así mismo, el paso ii) se caracteriza por la transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped o un órgano o tejido de una planta huésped que es susceptible de albergar la replicación y el movimiento del vector viral, así como la traducción de las N proteínas recombinantes.

25 En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que el vector viral de destino del paso ii) se encuentra en forma de un clon infectivo insertado en un vector binario y utiliza la transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens* como mecanismo de entrada en las células de la planta huésped generando así una planta multi-transgénica que expresa las N moléculas recombinantes, preferentemente N proteínas recombinantes, en forma de mosaico somático. Preferentemente, el vector viral está desprovisto de su función de movimiento sistémico. Más preferentemente, el vector viral se hace llegar a las células de la planta huésped mediante un sistema mecánico. Aún más preferentemente, el sistema mecánico se selecciona de entre el siguiente grupo: infiltración a vacío, infiltración por sobrepresión y espray.

35 En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una variante de secuencia de una familia de proteínas. Preferentemente, la familia de proteínas se selecciona de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, y lectinas.

40 En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que es combinado con un sistema de expresión sin interferencia homóloga que permite la producción de proteínas heteromultiméricas donde algunos de los componentes del multímero son variables y se producen mediante el sistema con interferencia, mientras que otros componentes son constantes y se producen mediante el sistema no interferente.

45 En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina. Preferentemente, la inmunoglobulina es producida por linfocitos obtenidos a partir de animales inmunizados frente a un antígeno.

50 En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina o su fragmento, seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes (phage display).

55 La presente invención hace referencia también al uso del método descrito anteriormente, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de homopolímeros.

60 Así mismo, la presente invención hace referencia también al uso del método descrito anteriormente para producir de forma recombinante una mezcla compleja de heteropolímeros donde cada célula produce un solo tipo de heteropolímero, minimizando el efecto de “barajado de cadenas”.

65 La presente invención hace referencia también a una planta transitoriamente multi-transgénica o un fragmento de la misma, caracterizada por que es obtenida en el paso iii) del método descrito anteriormente, planta o fragmento de planta (órgano, tejido) transfectados con una colección de clones virales como la descrita en el paso ii) del método descrito en la reivindicación 1, y que expresa una mezcla policlonal de proteínas.

Preferentemente, la planta o el fragmento de la misma expresa en todo o en parte y de modo recombinante, al menos un repertorio complejo de anticuerpos policlonales. Más preferentemente, los anticuerpos policlonales son similares a los producidos por un animal o un grupo de animales en respuesta a un proceso de inmunización frente a un antígeno, un grupo de antígenos o un agente patógeno.

5

La presente invención hace referencia también a un extracto crudo obtenido de una planta descrita anteriormente.

10

Así mismo, la presente invención hace referencia también a una mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto crudo descrito anteriormente.

15

Por último, la presente invención hace referencia también a un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por que se produce mediante el método descrito anteriormente. Preferentemente, las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes. Más preferentemente, las N proteínas recombinantes se seleccionan de entre el siguiente grupo: anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

20

El método de la invención comienza con el clonaje de los fragmentos de DNA que codifican las proteínas recombinantes en un vector viral derivado de un virus de plantas como TMV, PVX, CTV, CMV o cualquier otro virus que presente la propiedad de interferencia homóloga.

25

En una realización particular de la técnica, el vector deriva de un virus de RNA de simple cadena. En otra realización particular el vector viral consiste en un virus de RNA de simple cadena que mantiene en su genoma las funciones de replicación y de movimiento célula a célula pero que se le ha eliminado la función de movimiento sistémico. El movimiento sistémico, que tiene lugar a través de los haces vasculares, puede generar cuellos de botella en la extensión de los clones virales a lo largo de la planta, con lo que su supresión facilita la reproducibilidad de la técnica.

30

La transferencia de los fragmentos de DNA al vector viral se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas de ensamblaje de fragmentos de DNA accesibles al estado del arte, como digestión/ligación con enzimas de restricción tipo II, digestión/ligación cíclica con enzimas de restricción tipo IIS, recombinación sitio-específica, clonaje independiente de ligasa, recombinación homóloga o técnicas de ensamblaje por PCR.

35

Los fragmentos de DNA pueden incorporarse, bien de uno en uno, bien en grupo, generando una genoteca de vectores virales, cada uno comprendiendo una secuencia distinta.

40

En una realización particular de la técnica, los distintos fragmentos de DNA pueden codificar distintos anticuerpos completos comprendiendo distintas secuencias variables provenientes de humanos, de ratón, de camélidos o de otros mamíferos.

45

En otra realización particular los fragmentos de DNA pueden codificar fragmentos de anticuerpos del tipo scFv o VHH provenientes de humanos, de ratón, de camélidos o de otros mamíferos.

50

En otra realización particular, cada vector viral puede incorporar dos o más fragmentos de DNA en dos posiciones distintas de su genoma, codificando, por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo y la correspondiente cadena ligera del mismo anticuerpo de forma que la co-expresión de ambas en la misma célula dé lugar a una combinación funcional.

55

En todos los casos, el resultado final será una colección de F clones del vector viral conteniendo fragmentos o combinaciones de fragmentos recombinantes de DNA que en su conjunto representan N secuencias distintas, donde N es cualquier valor entre 2 y F.

60

A continuación, los F clones virales comprendiendo N secuencias recombinantes distintas son transferidos de forma conjunta y simultánea a las células vegetales de la planta huésped utilizando alguno de los mecanismos del estado del arte para inducir la formación de replicones virales. La planta huésped puede ser cualquier especie vegetal susceptible de albergar un replicón viral. Puede tratarse de una planta completa o un explanto de ésta como una hoja u otro órgano como un fruto o una raíz. En una realización particular, la planta huésped es una planta del género *Nicotiana*. En otra realización particular la planta huésped pertenece a la especie *Nicotiana benthamiana*.

65

En una realización particular, la transferencia conjunta de los distintos clones virales a las células de la planta huésped puede estar mediada por la bacteria *Agrobacterium*. Dicha bacteria es capaz de transferir a la célula vegetal un fragmento de DNA (T-DNA) que comprende el o los genes de interés, de forma que sean producidos por la célula vegetal. La transferencia es transitoria porque no requiere integración del T-DNA en el cromosoma de la célula, por tanto el T-DNA no se transfiere a la línea germinal y su expresión dura unos pocos días. En esta

realización particular, los replicones virales pueden introducirse íntegramente dentro del T-DNA a transferir en forma de un DNA copia introducida en el T-DNA de la bacteria. De este modo, *Agrobacterium* funciona como lanzadera para transferir el replicón viral al interior de la célula.

5 Para obtener la producción policlonal de proteínas recombinantes utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como lanzadera, la genoteca de vectores virales ha de estar preferentemente integrada en un vector binario que contenga un T-DNA, de modo que la secuencia viral se encuentre bajo la regulación de un promotor que opera en la célula huésped. Cada uno de los clones de la colección de vectores binarios se transfiere, bien de uno en uno, bien de forma conjunta, a células *Agrobacterium tumefaciens*, generando una colección policlonal de cepas de *Agrobacterium*. Este proceso se puede bien realizar directamente, bien mediante un paso intermedio en *Escherichia coli* que facilite el proceso de transformación. En este segundo caso, la genoteca se transfiere primero a células de *Escherichia coli*, dando lugar a una colección de colonias independientes. Posteriormente las colonias se crecen independientemente o de forma conjunta en condiciones que minimicen la pérdida de diversidad, aislándose a partir de dichas colonias la colección de plásmidos binarios. A partir de esta última preparación se procede a la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* para dar lugar a una colección "semilla" de *Agrobacterium*.

La colección "semilla" comprende uno o varios cultivos de *Agrobacterium* obtenidos a partir de la transformación inicial de la colección de plásmidos binarios en una preparación de células competentes de *Agrobacterium*. La colección puede ser mantenida en forma de F cultivos de *Agrobacterium*, cada uno albergando uno de los F clones, mantenidos de forma separada y almacenados en condiciones de congelación. En este caso F ha de ser mayor o igual que N. Esta opción es la habitual para un N número pequeño y conocido, como 5, 10, 20 o 100 secuencias distintas, en cuyo caso F es habitualmente igual a N. También es el caso habitual para un número N pequeño pero desconocido, como 5, 10, 20 o 100 secuencias distintas, en cuyo caso F es habitualmente mayor que N. Alternativamente, cuando N es un número grande, generalmente mayor que 10 y habitualmente mayor que 50 e incluso mayor que 1000, la colección "semilla" puede conservarse en forma un stock conjunto mantenido en condiciones de congelación o liofilización que contiene un número F de bacterias viables, donde F es mucho mayor, al menos un orden de magnitud mayor que N.

30 Para obtener una mezcla policlonal recombinante, el cultivo semilla de *Agrobacterium* se cultiva el tiempo suficiente para al menos duplicar y habitualmente multiplicar por 5 o incluso por 10 o más el número inicial de células contenidas en la alícuota inicial. A continuación este cultivo se transfiere a una solución tampón adecuada, se diluye convenientemente obteniéndose la mezcla de infiltración, que posteriormente se inoculara en algún punto discreto de la planta huésped mediante alguna de las tecnologías de agroinoculación disponibles en el estado del arte.

En una realización particular, los clones virales están desprovistos de la capacidad de movimiento sistémico. En este caso se hace llegar artificialmente la mezcla de infiltración al mayor número posible de células huésped. Para ello se ponen en contacto las células de *Agrobacterium* presentes en la mezcla de infiltración con las células de la planta huésped de forma que las primeras sean competentes para transferir su T-DNA a las segundas de forma eficiente. Esto se puede llevar a cabo mediante agroinfiltración, mediante inmersión a vacío o mediante cualquier otro sistema asequible al estado del arte, como técnicas de spray, uso de abrasivos, surfactantes, etc.

45 Una vez el T-DNA alcanza el núcleo de algunas células, el replicón se transcribe, dando lugar a un genoma viral activo que se replica en la célula inicial y se transfiere a las células vecinas. A continuación la planta infectada por la mezcla policlonal de replicones se mantiene en condiciones favorables de luz y humedad por un periodo variable de tiempo que comprende entre 4 días como mínimo y el ciclo completo de crecimiento de la planta como máximo; durante este tiempo los clones virales se replican, se mueven célula a célula hasta encontrar una célula ocupada por otro replicón, y traducen la proteína de interés cuya información albergan en su genoma. En conjunto, el resultado final es una distribución en mosaico de los diferentes clones a lo largo y ancho de la superficie de la planta. En dicho mosaico, cada tesela está formada por un número variable de células. Las células interiores de la tesela expresan exclusivamente una de las proteínas recombinantes de la mezcla, o cuando menos la expresan en una proporción molar muy mayoritaria, donde el rango de contaminación con otras proteínas de la mezcla es menor al límite de detección de proteínas fluorescentes en un microscopio confocal y en cualquier caso menor del 10% en relación molar. Excepcionalmente algunas células situadas en la frontera entre dos teselas contiguas pueden expresar más de una proteína recombinante en proporciones molares cercanas a 50%. El número total de éstas células frontera susceptibles de expresar simultáneamente más de una proteína recombinante está en función del tamaño medio de la teselas. El tamaño medio de las teselas depende a su vez de la concentración de células de *Agrobacterium* en la mezcla de infiltración, y por extensión de la densidad óptica total del cultivo (ODT), siendo este parámetro modulable experimentalmente. En conjunto, el número máximo de células susceptibles de co-expresar de forma detectable más de una proteína fluorescente puede ser ajustado experimentalmente de forma que sea menor del 10%, o menor del 5% y eventualmente menor del 1%.

65

Transcurrido el tiempo de incubación, se cosecha el material vegetal y se purifica el conjunto de proteínas interés utilizando un método de purificación que sea común a todos los componentes de la mezcla, obteniéndose una mezcla policlonal de proteínas de composición definida.

5 La presente invención permite modular el tamaño y número de teselas del mosaico de expresión mediante la manipulación de la densidad óptica de la mezcla de infiltración. Así, mezclas de infiltración de N clones con ODT de 0.1 dan lugar a teselas de mayor tamaño que mezclas de infiltración conteniendo los mismos N clones a una ODT de 0.033. A su vez mezclas de infiltración de N clones con ODT de 0.033 dan lugar a teselas de mayor tamaño que mezclas de infiltración conteniendo los mismos N clones a una ODT de 0.01. Las teselas grandes
10 conteniendo de media varias decenas o incluso centenares de células necesitan de menores concentraciones de *Agrobacterium*, lo que facilita la eliminación de posible toxinas asociadas a esta bacteria. Además el empleo de teselas grandes minimiza la interacción residual entre clones, ya que ésta tiene lugar fundamentalmente en la zona frontera entre teselas contiguas. Por su parte, la utilización de teselas pequeñas, comprendiendo unas pocas células o decenas de células de media, facilita la expresión de un mayor número de clones por planta, favoreciendo la diversidad policlonal. Asimismo, la utilización de teselas pequeñas formadas por unas pocas células o decenas de células minimiza la influencia de la velocidad de movimiento (V_i) en la composición final de la mezcla.

20 En la presente invención se hace referencia a una colección "semilla", la cual comprende un número N de clones distintos y conocidos, conservados de forma separada en forma de N cultivos criopreservados. Así mismo, la presente invención permite modular la composición final de la mezcla policlonal mediante la manipulación de la composición de la mezcla de infiltración. Dado un tiempo de incubación suficientemente largo para que se hayan colonizado todas las células de la planta, la abundancia relativa de cada proteína en la mezcla (C_i) estará en función de los siguientes parámetros: (V_i) la velocidad de movimiento célula a célula de cada clon; (P_i) los niveles de producción de proteína específicos de cada clon; (ODR_i) la abundancia relativa de cada clon en el inóculo inicial. Siendo P_i y V_i valores constantes y específicos para cada clon, es posible manipular la composición de la mezcla modificando los valores de ODR_i para cada clon. Para ello, los N clones semilla son crecidos de forma separada el tiempo suficiente para al menos duplicar y habitualmente multiplicar por 5 o incluso por 10 o más el número inicial de células contenidas en la alícuota inicial. A continuación se determina la densidad óptica de cada cultivo y se procede a mezclar los distintos cultivos en proporciones definidas para dar lugar a la mezcla de infiltración final. La manipulación de las ODs relativas de cada clon permite modular de forma significativa y reproducible la composición final de la mezcla, ya que este parámetro determina la abundancia relativa de los foci iniciales que infectan a la planta para cada clon.

35 En una realización particular de la técnica, la expresión policlonal basada en vectores virales con interferencia homóloga se combina con otro sistema de expresión que no presenta el fenómeno de interferencia homóloga. En una realización particular, el segundo sistema "no interferente" consiste en la transferencia mediada por *Agrobacterium* de un T-DNA que no comprende ninguna estructura autoreplicativa. Esta realización particular permite producir complejos multiprotéicos recombinantes en la que uno o varios de los componentes de la mezcla son variables y se expresan mediante el uso de una plataforma con interferencia homóloga, y el resto de los componentes son constantes para todos los clones y se co-expresan mediante un sistema sin interferencia homóloga. En otra realización particular del procedimiento mixto, la parte variable del complejo multiproteico está constituido por una mezcla policlonal de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, mientras que la parte constante está formada por un péptido constante que media la formación de estructuras poliméricas de anticuerpos como la cadena J, o por una estructura que protege a los anticuerpos frente a degradación proteolítica como el Componente Secretor.

50 En la presente invención, el término "repertorio complejo de N moléculas recombinantes" se refiere a N moléculas de DNA o RNA recombinantes, N proteínas recombinantes codificadas por dichas moléculas de DNA o RNA, o los metabolitos resultantes de la actividad de dichas N proteínas recombinantes. Preferentemente, este término se refiere a un conjunto de más de 10 moléculas de DNA o RNA que difieren entre sí al menos en un nucleótido de su secuencia nucleotídica o un conjunto de más de 10 proteínas distintas que difieren entre sí al menos en un amino-acido de su secuencia peptídica y que son producidas en un organismo distinto del que son originales mediante estrategias de DNA recombinante.

55 En la presente invención, el término "N proteínas recombinantes" se refiere a N enzimas, N inmunoglobulinas, N receptores de membrana, N receptores intracelulares, N lectinas N anticuerpos policlonales, N antivenenos basados en antisueros, N sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, y N inmunoglobulinas intravenosas.

60 En la presente invención, el término "colección de N secuencias nucleotídicas distintas" se refiere a un conjunto formado por un número indeterminado de fragmentos de DNA o RNA que difieren entre sí al menos en una posición nucleotídica dentro de su secuencia.

65 En la presente invención, el término "vector viral de destino" se refiere a un ácido nucleico derivado de un virus que codifica la funciones necesarias para su reproducción en la célula huésped y en el cual se integran de forma

recombinante aquellos fragmentos de ácidos nucleicos que se pretende expresar de forma recombinante.

En la presente invención, el término “colección de clones virales” se refiere a un conjunto de ácidos nucleicos derivados de un virus que difieren en su secuencia en al menos en un nucleótido.

5

En la presente invención, el término “planta huésped” se refiere a cualquier organismo vegetal en cuyas células puede tener lugar la replicación de un virus o un vector viral.

10

En la presente invención, el término “planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático o un fragmento de la misma” se refiere a una planta completa o un fragmento de una planta que comprende un conjunto de más de dos células, en las cuales se ha introducido mediante técnicas de transformación genética un conjunto de transgenes de manera tal que cada célula individual recibe y expresa cero, uno o más de un transgen, los cuales transgenes no son necesariamente idénticos a los que recibe y expresa el resto de las células del conjunto, y en las que el paquete de cero uno o más genes recibidos puede o no integrarse establemente en el genoma y por tanto puede o no transmitirse a la progenie y dejar de expresarse en dichas células al cabo de un cierto tiempo.

15

20

En la presente invención, el término “clon infectivo insertado en un vector binario” se refiere a una secuencia de DNA derivada de un virus vegetal que se encuentra insertada en un vector binario y que, transferido el conjunto al núcleo de una célula, es capaz de inducir su propia transcripción dando lugar a una molécula de RNA con capacidad para infectar la célula huésped.

25

En la presente invención, el término “transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens*” se refiere a una transferencia de una o más moléculas de DNA desde el citoplasma de la bacteria *Agrobacterium* al núcleo de la célula vegetal, que tiene lugar de forma transitoria sin que ocurra necesariamente la integración estable de dichas moléculas de DNA o parte de las mismas en el DNA cromosómico de la célula huésped.

30

En la presente invención, el término “función de movimiento sistémico” se refiere a la capacidad de un virus vegetal de moverse largas distancias dentro de la planta huésped viajando a través de su sistema vascular.

35

En la presente invención, el término “sistema mecánico” se refiere a cualquier procedimiento que implique la aplicación de una fuerza, una presión externa o una corriente eléctrica o cualquier otro mecanismo de permeabilización de membrana para favorecer la entrada de un DNA en la célula huésped.

40

En la presente invención, el término “variante de secuencia de una familia de proteínas” se refiere a cada una de las variantes individuales que se pueden presentar en un conjunto de proteínas de una misma familia.

45

En la presente invención, el término “sistema de expresión sin interferencia homóloga” se refiere a cualquier sistema de producción de proteínas recombinantes que esté basado en un vector que de forma natural no presenta el fenómeno de interferencia homóloga, es decir, que en el caso de que dos o más clones de dicho vector colonicen la misma célula, éstos no se excluyen necesariamente entre sí de modo que ninguno de ellos prevalece necesariamente sobre los demás.

50

En la presente invención, el término “secuencias variables de inmunoglobulinas” se refiere a las regiones de proteínas inmunoglobulinas que presentan alta variabilidad de secuencia y donde reside su capacidad de unión al antígeno.

55

En la presente invención, el término “secuencias variables de inmunoglobulinas o sus fragmentos seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes como phage display” se refiere a todo o parte de una o varias regiones variables de inmunoglobulinas seleccionadas por su capacidad de unión a un determinado antígeno o conjunto de antígenos mediante procedimientos de selección *in vitro*.

60

En la presente invención, el término “repertorio complejo de anticuerpos policlonales” se refiere a un conjunto formado por un número mayor de diez proteínas inmunoglobulinas distintas, donde la diferencia entre ellas radica, al menos parcialmente, en la secuencia aminoacídica de sus regiones variables.

65

En la presente invención, el término “extracto crudo” se refiere a una mezcla compleja de compuestos, obtenida a partir de una planta o tejido vegetal y que se obtiene mediante un proceso de extracción que incluye la ruptura de las células del tejido vegetal a partir del que se obtiene y la solubilización de los compuestos celulares liberados en un solvente adecuado.

En la presente invención, el término “mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto crudo” se refiere a un conjunto de N anticuerpos distintos, que difieren entre sí al menos en un aminoácido de su secuencia peptídica, aislados a partir de un extracto crudo del material vegetal donde se producen de forma recombinante en condiciones que permiten la eliminación total o parcial del resto de los

compuestos celulares presentes en el extracto.

En la presente invención, el término "repertorio complejo de antivenenos basados en antisueros" se refiere a un conjunto de inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros de animales inmunizados con una sustancia tóxica.

En la presente invención, el término "repertorio complejo de sueros inmunológicos para inmunidad pasiva" se refiere a un conjunto de inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros de animales inmunizados frente a un agente patógeno o una sustancia tóxica y que resultan efectivos en la protección de un organismo receptor frente a dicho agente patógeno o dicha sustancia, sin necesidad de activar una respuesta inmunológica en el organismo receptor.

En la presente invención, el término "repertorio complejo de inmunoglobulinas intravenosas" se refiere a un conjunto formado por un número indeterminado de inmunoglobulinas distintas que se pueden suministrar a un animal o a un ser humano por vía intravenosa para producirle algún tipo de beneficio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Producción individualizada de VHHs. (A) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las 9 VHHs producidas en plantas de *N. benthamiana*: SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 6, SEQ. ID. No. 7, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9. (B) Análisis Western Blot de las diferentes VHHs producidas de forma individualizada.

Figura 2. Producción de un repertorio oligoclonal de VHHs en una planta transitoriamente oligo-transgénica. (A) Análisis SDS-PAGE de fracciones purificadas (E1 y E2) y último lavado (F) de un repertorio de 9 VHHs producidas en una planta transitoriamente oligo-transgénica de la invención. El bandeo discreto de proteínas está revelado con azul de Coomassie. (B) Electroforesis en 2D con revelado de nitrato de plata de la fracción E2.

Figura 3. Producción de un repertorio policlonal de VHHs en una planta transitoriamente multi-transgénica. (A) Análisis SDS-PAGE de fracciones purificadas (E1 y E2) y el último lavado (F) de un repertorio formado por un número indefinido de VHHs ($F > 10^4$) producidas en una planta transitoriamente multi-transgénica de la invención. El bandeo continuo de proteínas está revelado con azul de Coomassie. (B) Electroforesis 2D con revelado mediante marcaje fluorescente diferencial (DIGE) de tres fracciones E2 correspondientes a tres experimentos independientes de producción de VHHs policlonales. Los tres experimentos se realizaron a partir de un mismo cultivo semilla de *Agrobacterium tumefaciens* que alberga una genoteca de VHHs obtenidas de sueros de camellos no hiper-inmunizados.

Figura 4. Gráficos de dispersión de las fracciones purificadas de VHH policlonales producidas en tres experimentos independientes. El eje de abscisas representa el ratio de intensidad entre dos experimentos para cada spot. El eje de ordenadas representa la intensidad absoluta (volumen) de cada spot en el experimento DIGE.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficacia de la invención en producir plantas multi-transgénicas así como la reproducibilidad del método para la producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes, objeto de la presente invención. En concreto, los ensayos realizados muestran la producción de repertorios complejos de N proteínas recombinantes. La existencia de N proteínas recombinantes necesariamente implica la presencia de N moléculas de DNA y RNA recombinantes precursores de las mismas. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Producción de una mezcla oligoclonal de nano-anticuerpos de camello (VHHs) en plantas de *N. benthamiana* transitoriamente oligo-transgénicas

Para demostrar las posibilidades de la expresión policlonal basada en interferencia homóloga para la producción de mezclas de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes de interés industrial o

farmacéutico, se utilizó de manera preferente y no limitante una pequeña colección de clones de fragmentos de anticuerpos camélidos de simple cadena (también llamados nanobodies o VHHs).

5 En este ejemplo se comprobó la posibilidad de producir simultáneamente un número discreto ($N < 10$) de proteínas recombinantes dando lugar a una mezcla de composición definida (oligoclonal) donde se conoce la identidad de todas y cada una de las proteínas de la mezcla. Para ello una población de VHHs fue amplificada a partir de una preparación de cDNA obtenida de una fracción de células nucleadas de sangre de camello utilizando los oligonucleótidos VHHF (SEQ. ID. No. 10) y VHHR (SEQ. ID. No. 11). A partir de la dicha amplificación, las VHHs fueron transferidas al vector pGTMV (SEQ. ID. No. 12) utilizando una reacción GoldenGate de un solo fragmento (Engler et al., 2009; Engler et al., 2008; Sarrion-Perdigones et al., 2011) mediada por ligasa de T4 y el enzima de restricción BsaI en una incubación de 35 ciclos. De esta forma se aislaron los nueve clones distintos (pGTMV_VHH1 hasta pGTMV_VHH9) que se utilizaron en la expresión oligoclonal. Todas las construcciones contenían una fusión a una cola de seis histidinas incorporadas por el vector pGTMV. Las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes de cada una de las 9 VHHs clonadas se muestran como SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 6, SEQ. ID. No. 7, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. 9. Un alineamiento amino-acídico de las secuencias VHH implicadas en el experimento se muestra en la FIGURA 1A.

20 En primer lugar se ensayó la expresión individualizada de las diferentes VHH. Todos los clones derivados de pGTMV fueron transferidos a *Agrobacterium tumefaciens* y conservados en forma de cultivos semilla. Posteriormente, una alícuota de 10 μ L de cada uno de los cultivos semilla se descongeló y se creció a 28°C en agitación (200 rpm) durante 18h en 1 mL de LB con 12 μ g/mL de Carbencilina y 50 μ g/mL de Rifampicina. A continuación, 100 μ L de cada cultivo se transfirieron a 5 mL de LB con 12 μ g/mL de Carbencilina y 50 μ g/mL de Rifampicina y se crecieron durante 18h a 28°C en agitación (200 rpm). Los cultivos resultantes se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos y el precipitado de células se resuspendió en 10 mL de tampón de infiltración (MES 10mM pH 5,6, Cloruro cálcico 10mM, acetosiringona 2 μ M).

30 De igual forma se procedió con cultivos de *Agrobacterium* que albergan el módulo 5' de TMV deconstruido (pICH17388) y el módulo integrasa (PICH14011) necesarios para el establecimiento del replicón viral (Marillonnet et al., 2004a). Se midió la densidad óptica (OD) de cada cultivo de *Agrobacterium* y se realizaron las diluciones pertinentes en tampón de infiltración para llevar cada cultivo a una OD=0.1 medida en un espectrómetro. Posteriormente se realizaron nueve mezclas, una para cada VHH (pGTMV_VHHi: pICH17388: PICH14011 en proporción 1:1:1), y cada mezcla se infiltró por separado en los espacios intercelulares de hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante una jeringa de 2 mL sin aguja. Se infiltraron 3 hojas por muestra, utilizando para ello plantas diferentes. Durante los días siguientes a la infiltración se observó en algunos clones la aparición de un fenómeno de necrosis similar a la respuesta hipersensible (HR) por lo que se decidió adelantar el proceso de recolección con anterioridad a la aparición de síntomas (6 dpi) y recolectar todas las plantas en esa fase. Tras la recolección las muestras (hojas enteras) se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a -80°C. Para la extracción el material vegetal se trituró el material vegetal en un mortero en presencia de nitrógeno líquido con tampón PBS en proporción 1:3 (peso de tejido: volumen de tampón). Posteriormente el extracto crudo se centrifugó a 10 krpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se filtró dos veces con papel de filtro y una vez más en filtros steriCup. El extracto resultante se pasó por una columna de afinidad Ni Agarose y la proteínas purificadas se eluyeron en tampón fosfato 50 mM a pH4.0 y la fracción de elución se neutralizó inmediatamente con 1/5 de volumen de PBS. Una alícuota de 6 μ L de cada elución se resolvió en una electroforesis PAGE y se reveló por Western blot utilizando un anticuerpo primario murino anti-histidinas seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a la peroxidasa de rábano. El resultado de dicho Western blot se puede observar en la FIGURA 1B. Todas las VHHs ensayadas se expresaron y purificaron en *N. benthamiana*, aunque con distintos rendimientos. Así, las VHH4, VHH5, VHH6, VHH7, VHH8 y VHH9 se produjeron a niveles entre 80 y 120 μ g de proteína purificada por gramo de peso fresco, mientras que para las tres VHHs restantes se obtuvieron niveles de entre 2 y 10 μ g de proteína por gramo de peso fresco.

55 Seguidamente se ensayó la expresión oligoclonal de las nueve VHHs. Para ello los cultivos semilla se crecieron individualmente tal y como se describió en el experimento anterior, pero en este caso todos los cultivos se combinaron en una sola mezcla de infiltración formada por los cultivos (pGTMV_VHH1: pGTMV_VHH2: pGTMV_VHH3: ... :pGTMV_VHH9 :pICH17388: PICH14011) en proporción (1:1:1: ... :1:9:9). Se realizó una única infiltración en tres hojas de tres plantas distintas de *N. benthamiana*. Transcurridos 6 dpi, el material vegetal se recolectó y las proteínas recombinantes se purificaron siguiendo el procedimiento descrito más arriba. Como resultado se obtuvo una mezcla de VHHs con un rendimiento de 80 μ g de proteína purificada por gramo de peso fresco. La mezcla se resolvió mediante electroforesis PAGE como se muestra en la FIGURA 2A. En esta figura se muestran las carreras correspondientes al último lavado (F) y dos eluciones sucesivas (E1 y E2) del proceso de purificación. En dicha electroforesis, revelada con azul de Coomassie, se observa un patrón discreto de bandas compatible con la expresión simultánea de varias VHHs. Dado que las distintas VHHs tienen tamaños similares, a continuación se procedió a resolverlas atendiendo a las diferencias de punto isoeléctrico mediante una electroforesis en dos dimensiones. Así, 25 μ g de la mezcla policlonal recombinante previamente purificada por afinidad se resolvieron en geles de 2D con un rango de pH entre 4.0 y 9.0, y posteriormente se detectaron

mediante tinción con plata. En la FIGURA 2B se muestra el resultado de la electroforesis 2D, en la que es posible identificar un mínimo de 9 spots diferenciados en la banda de pesos moleculares correspondientes a las proteínas del tipo VHH, lo que demuestra la composición oligoclonal de la muestra.

5 EJEMPLO 2. Producción de una mezcla policlonal de anticuerpos VHH

En este ejemplo se demuestra la posibilidad de producir repertorios complejos o muy complejos ($N > 100$) de proteínas recombinantes de composición desconocida de forma reproducible. Para ello se realizó una reacción Goldengate con las VHHs amplificadas con los oligos SEQ. ID. No. 1, y SEQ. ID. No. 2 a partir de cDNA obtenido de una fracción de células nucleadas de sangre de camello y dicha mezcla de reacción se transformó directamente en células competentes de *Agrobacterium* GV2011 sembrándose posteriormente en placas LB agar suplementadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Los 2×10^4 clones resultantes se recogieron directamente de las placas en alícuotas de 0.5 mL de medio LB y se congelaron a -80°C en presencia de 15% glicerol. Posteriormente se descongeló una de las alícuotas y se subcultivó en 5 mL de LB durante 2 horas. El cultivo resultante (cultivo pGTMV_VHHp) se centrifugó a 500 g durante 15 minutos y el precipitado de células se resuspendió en 10 mL de tampón de infiltración (MES 10mM pH 5,6, Cloruro cálcico 10mM, acetosiringona 2 μM). De igual forma se procedió con cultivos de *Agrobacterium* que albergan el módulo 5' de TMV deconstruido (pICH17388) y el módulo integrasa (PICH14011) necesarios para el establecimiento del replicón viral (Marillonnet et al., 2004b). Se midió la OD de cada cultivo de *Agrobacterium* y se realizaron las diluciones pertinentes en tampón de infiltración para llevar cada cultivo a una OD=0.1 medida en un espectrómetro. Posteriormente se combinaron los cultivos en la proporción adecuada (1:1:1) (pGTMV_VHHp : pICH17388: PICH14011) y se procedió a infiltrar las mezclas en hojas de *N. benthamiana*. Para comprobar la reproducibilidad de la expresión policlonal, el mismo experimento se repitió en otras dos ocasiones con un grupo distinto de plantas partiendo de dos nuevas alícuotas criopreservadas del pGTMV_VHHp. En total se realizaron tres experimentos independientes (EXP1, EXP2 y EXP3). En todos los casos se dejaron transcurrir seis días desde la infiltración y la recolección. Transcurridos los 6 dpi en cada caso, el material vegetal se recolectó separadamente y las proteínas recombinantes se purificaron siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior. Un análisis PAGE de las VHHs purificadas no reveló diferencias en el patrón de tamaños de la mezcla (FIGURA 3A). En esta figura se muestran las carreras correspondientes al último lavado (F) y dos eluciones sucesivas (E1 y E2) del proceso de purificación de uno de los experimentos. En dicha electroforesis, revelada con azul de Coomassie, se observa un patrón continuo de bandas compatible con la expresión simultánea de múltiples VHHs.

Posteriormente las tres mezclas policlonales de VHHs se resolvieron de forma conjunta atendiendo a las diferencias de punto isoeléctrico mediante una electroforesis en dos dimensiones. Así, 10 μg de cada mezcla policlonal recombinante previamente purificada por afinidad se etiquetaron cada una con un fluoróforo diferente y se sometieron a un análisis DIGE resolviéndose en un gel de 2D con un rango de pH entre 4.0 y 9.0. El escaneado posterior muestra la huella 2D de cada una de las mezclas recombinantes marcada con un fluoróforo diferente. El patrón de distribución de los spots resultó muy similar en los tres experimentos (FIGURA 3B), lo que demuestra la reproducibilidad de la técnica. Los gels de 2D se analizaron con el paquete de software Decyder. Se detectaron un número mínimo de 216 spots mayoritarios. Todos spots mayoritarios resultaron ser coincidentes en los tres experimentos. A partir de los datos de volumen de cada spot se realizó un análisis de dispersión de los datos entre los diferentes experimentos tomados de dos en dos. En la FIGURA 4A se muestra gráficamente la estrecha distribución de la dispersión entre experimentos, lo que indica una alta reproducibilidad entre experimentos independientes. La gráfica de dispersión mostrada en la FIGURA 4 representa para cada punto el logaritmo del ratio entre las intensidades relativas de dicho punto en los dos experimentos en comparación. La altura en el eje de ordenadas representa la intensidad (volumen) de cada spot analizado. Se observa que sólo algunos spots de muy baja intensidad presentan diferencias significativas, posiblemente debidos a diferencias de sensibilidad, mientras que la mayoría de los spots están centrados en un margen muy estrecho en torno al valor cero de logaritmo de los ratios de expresión.

Se han realizado ensayos de secuenciación masiva que muestran la producción de repertorios complejos de N moléculas recombinantes. Por último se ha ensayado la producción de repertorios complejos de anticuerpos recombinantes obtenidos a partir de animales hiper-inmunizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Bregenholt S, Jensen A, Lantto J, Hyldig S and Haurum JS (2006) Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections. *Curr Pharm Des* 12:2007-2015.
- 5 Dunman PM and Nesin M (2003) Passive immunization as prophylaxis: when and where will this work? *Curr Opin Pharmacol* 3:486-496.
- Elena SF, Bedhomme S, Carrasco P, Cuevas JM, de la Iglesia F, Lafforgue G, Lalic J, Prosper A, Tromas N and Zwart MP (2011) The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact* 24:287-293.
- 10 Engler C, Gruetzner R, Kandzia R and Marillonnet S (2009) Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS one* 4:e5553.
- Engler C, Kandzia R and Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS one* 3:e3647.
- 15 Folimonova SY (2012) Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. *J Virol* 86:5554-5561.
- Gleba Y, Marillonnet S and Klimyuk V (2004) Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol* 7:182 - 188.
- Haurum JS (2006) Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? *Drug Discov Today* 11:655-660.
- 20 Klitgaard JL, Coljee VW, Andersen PS, Rasmussen LK, Nielsen LS, Haurum JS and Bregenholt S (2006) Reduced susceptibility of recombinant polyclonal antibodies to inhibitory anti-variable domain antibody responses. *J Immunol* 177:3782-3790.
- Koefoed K, Steinaa L, Soderberg JN, Kjaer I, Jacobsen HJ, Meijer PJ, Haurum JS, Jensen A, Kragh M, Andersen PS and Pedersen MW (2011) Rational identification of an optimal antibody mixture for targeting the epidermal growth factor receptor. *MAbs* 3:584-595.
- 25 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I and Robl JM (2002) Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 20:889-894.
- Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V and Gleba Y (2004a) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6852-6857.
- 30 Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V and Gleba Y (2004b) In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* (vol 18, pg 3852, 2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15546-15546.
- 35 Orzaez D, Granell A and Blazquez MA (2009) Manufacturing antibodies in the plant cell. *Biotechnology journal* 4:1712-1724.
- Pedersen MW, Jacobsen HJ, Koefoed K, Hey A, Pyke C, Haurum JS and Kragh M (2010) Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy. *Cancer Res* 70:588-597.
- 40 Sardanyes J and Elena SF (2011) Quasispecies spatial models for RNA viruses with different replication modes and infection strategies. *PLoS one* 6:e24884.
- Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juarez P, Fernandez-Del-Carmen A, Granell A and Orzaez D (2011) GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLoS one* 6:e21622.
- 45 Sharon J, Sarantopoulos S, Den W, Kao CY, Baecher-Allan CM, Santora KE, Sompuram SR, Petersen MS and Williams BR (2000) Recombinant polyclonal antibody libraries. *Combinatorial-Chemistry-and-High-Throughput-Screening*[print] June, 2000;@3:185-196.
- Syller J (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol Plant Pathol* 13:204-216.
- 50 Wiberg FC, Rasmussen SK, Frandsen TP, Rasmussen LK, Tengbjerg K, Coljee VW, Sharon J, Yang CY, Bregenholt S, Nielsen LS, Haurum JS and Tolstrup AB (2006) Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 94:396-405.

Ziebell H and Carr JP (2010) Chapter 6 - Cross-Protection: A Century of Mystery, in *Adv Virus Res* (John PC and Gad L eds) pp 211-264: Academic Press.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de al menos un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por comprender los siguientes pasos:
- 10 i) ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas en un vector viral de destino de forma tal que se genere una colección de N clones virales;
- 15 ii) transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped,
- 20 iii) generación de una planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático donde más del 80% de las células expresan exclusivamente una de las N moléculas recombinantes, o bien la expresan muy mayoritariamente, en una proporción molar que supone al menos el 80% del total de N moléculas recombinantes producidas en esa misma célula.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes.
3. El método según las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que el vector viral de destino del paso ii) se encuentra en forma de un clon infectivo insertado en un vector binario y utiliza la transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens* como mecanismo de entrada en las células de la planta huésped.
4. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que el vector viral está desprovisto de su función de movimiento sistémico.
5. El método según la reivindicación 4, caracterizado por que el vector viral se hace llegar a las células de la planta huésped mediante un sistema mecánico.
6. El método según la reivindicación 5, caracterizado por que el sistema mecánico se selecciona de entre el siguiente grupo: infiltración a vacío, infiltración por sobrepresión y espray.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una variante de secuencia de una familia de proteínas.
8. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que la familia de proteínas se selecciona de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, y lectinas.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, combinado con un sistema de expresión sin interferencia homóloga.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina.
11. El método según la reivindicación 10, caracterizado por que la inmunoglobulina es producida por linfocitos obtenidos a partir de animales inmunizados frente a un antígeno.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina o su fragmento, seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes.
13. Uso del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de homopolímeros.
14. Uso del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de heteropolímeros.
15. Una planta transitoriamente multi-transgénica o un fragmento de la misma, caracterizada por que es obtenida en el paso iii) del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
16. La planta o el fragmento de la misma según la reivindicación 15, caracterizada por que expresa, al menos un repertorio complejo de anticuerpos policlonales.
17. La planta o el fragmento de la misma según la reivindicación 16, caracterizada por que los anticuerpos policlonales son similares a los producidos por un animal o un grupo de animales en respuesta a un proceso de inmunización frente a un antígeno, un grupo de antígenos o un agente patógeno.

18. Un extracto crudo obtenido de una planta descrita en cualquiera de las reivindicaciones 15-17.
- 5 19. Una mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto descrito en la reivindicación 18.
20. Un repertorio complejo de N moléculas recombinantes caracterizado por que se produce mediante el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 10 21. El repertorio según la reivindicación 20, caracterizado por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes.
- 15 22. El repertorio según la reivindicación 21, caracterizado por que las N proteínas recombinantes se seleccionan de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, lectinas, anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

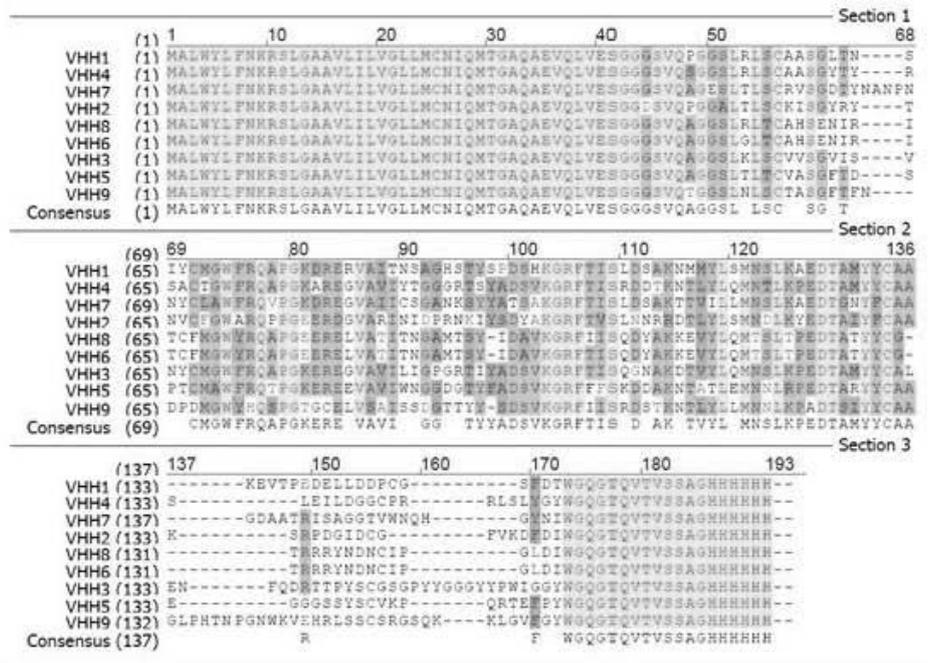


FIGURA 1A

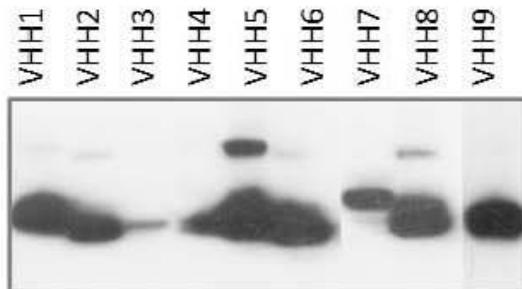


FIGURA 1B

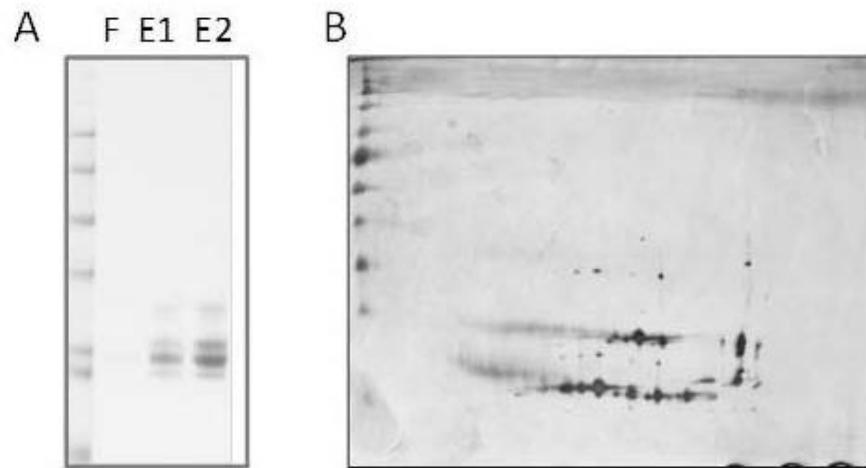


FIGURA 2

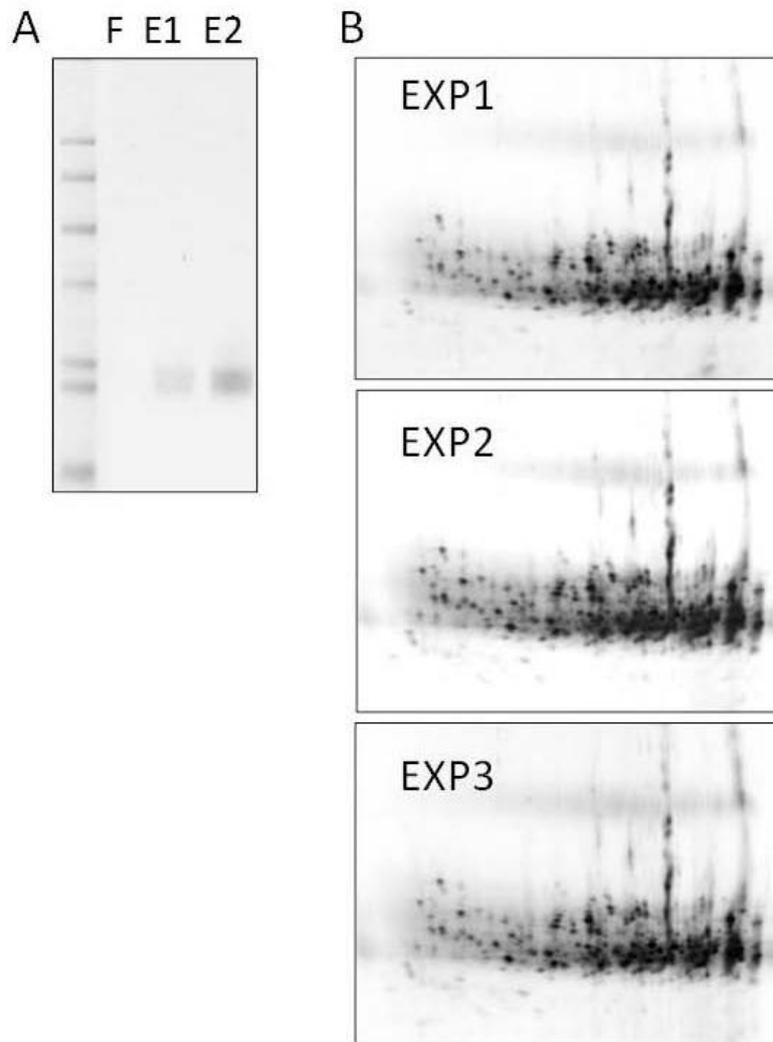
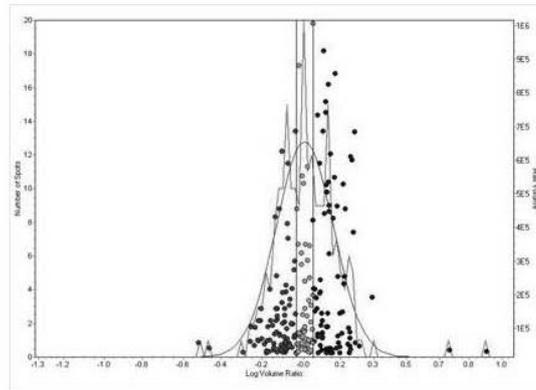
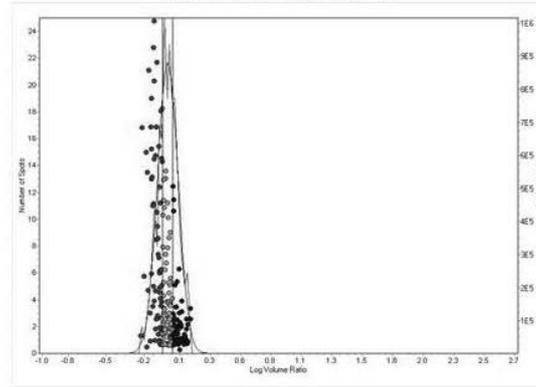


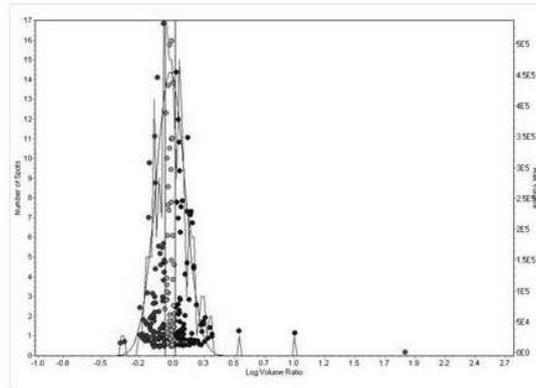
FIGURA 3



EXP1 versus EXP2



EXP2 versus EXP3



EXP1 versus EXP3

FIGURA 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
 UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

<120> METODO DE PRODUCCION DE REPERTORIOS COMPLEJOS DE MOLECULAS RECOMBINANTES

<130> ND

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 513

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 1

```

atggcctttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tatacttggt      60
gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag      120
tctgggggag gctcgggtgca gcctggaggg tctttgagac tctcctgtgc agcctctgga      180
ttaaccaaca gtatctattg catgggttgg ttccggcagg ctccagggaa ggaccgtgag      240
cgggtcgcaa ttactaatag tgctggtcat agcacatact ctcccgactc ccacaagggc      300
cgattcacca tctccctaga ctctgccaag aatatgatgt atcttagtat gaacagcctg      360
aaagctgagg acacggccat gtattactgc gcggcaaaag aagtaacacc cgaggatgaa      420
ctccttgatg acccctgtgg aagctttgat acatggggcc aggggaccca ggtcaccgtc      480
tcctcagcag ggcaccacca tcaccatcac tag                                     513
    
```

<210> 2

<211> 510

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 2

```

atggcctttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tatacttggt      60
gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag      120
tccgggggag actcgggtgca gcctggaggg gctctgacct tctcctgtaa aatctctggc      180
taccgctaca ctaacgtctg cttcggatgg gcccggcagg ctccaggaga ggagcgtgac      240
ggggtcgcgc ggattaatat tgatcccagg aataagatct attccgacta cgcgaagggc      300
cgattcaccg tctcccttaa caaccgagg gacactttgt atctgagcat gaacgacctg      360
aaatatgaag acacggccat ctatttctgt gcggcaaagt cccggccgga cggaatcgat      420
tgtgggtttg tgaaggactt tgatatctgg ggccagggga cccaggtcac cgtctctca      480
gcagggcacc accatcacca tcactaatag                                     510
    
```

<210> 3

<211> 546

<212> DNA

<213> Camelus dromedarius

ES 2 456 823 B1

<400> 3
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tataacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag 120
 tctgggggag gctcgggtgca ggctggagga tctctgaaac tctcctgtgt agtctctgga 180
 gtcacacagc ttaactattg catgggctgg ttccgccagg ctccagggaa ggagcgtgag 240
 ggggtcgcag ttattcttat tggacctggt cgcacaatct atgccgactc cgtgaagggc 300
 cgattcacca tctccaagg caacgccaag gacacggtgt atctgcagat gaacagcctg 360
 aaacctgagg aactgccat gtactactgt gcattagaga atttccaaga caggaccaca 420
 ccctactcct gcgggtctgg tccatactat ggtggtggtt actaccctg gattggtggt 480
 tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc tcctcagcag ggcaccacca tcaccatcac 540
 taatag 546

<210> 4
 <211> 513
 <212> DNA
 <213> Camelus dromedarius

<400> 4
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tataacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag 120
 tctgggggag gctcgggtgca gagggtgagg tctctgagac tctcctgtgc agcctctgga 180
 tacacctatc gtagcgcctg cacgggttgg ttccgccagg ctccagggaa ggcgcgcgag 240
 ggggtcgcag tcatttacac tgggtggtggt cgcacatcct atgccgactc cgtgaagggc 300
 cgattcacca tctcccgaga cgacaccaag aacacgctct atctgcaaat gaacaccctg 360
 aaacctgagg aactgccat gtactactgc gcagcgtcac ttgagattct cgatggcggg 420
 tgtcccagga gactatcact ttatggctac tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc 480
 tcagcagggc accaccatca ccatcactaa tag 513

<210> 5
 <211> 516
 <212> DNA
 <213> Camelus dromedarius

<400> 5
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tataacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag 120
 tctgggggag gctcgggtgca ggctggagga tctctgacac tcaacttgtgt agcttctgga 180
 ttactgata gtccgacttg catggcctgg ttccgccaga ctccaggcaa ggagcgcgag 240
 gaggtcgcgg ttatttgaa tgggtggcgat ggaacatact ttgccgactc cgtgaagggc 300
 cgattcttct tctccaaaga cgacgccaag aacacggcta ctcttgagat gaacaacctg 360
 agacctgaag aactgcccg ttactactgt gcagcggagg gcggtggttc ttcttactcg 420
 tgcgtgaaac cccaacgtac tgagtttct tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc 480
 tcctcagcag ggcaccacca tcaccatcac taatag 516

ES 2 456 823 B1

<210> 6
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Camelus dromedarius

<400> 6
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tatacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag 120
 tctgggggag gctcgggtgca ggctggagga tctctaggac tcacctgtgc gactctgaa 180
 aacatccgga ttacttgctt catgggctgg taccgccagg ctccagggga ggagcgcgag 240
 ttggttgcca ctattactaa tgggtgcatg acttcctaca tagacgccgt gaagggccga 300
 ttcacatct cccaagacta tgccaagaag gaggtatatt tgcaaatgac cagcctgaca 360
 cctgaggaca cggccacgta ttactgtggc acccggaggc ggtacaatga taattgcata 420
 cccggcttgg atatctgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctcagc agggcaccac 480
 catcaccatc actaatag 498

<210> 7
 <211> 552
 <212> DNA
 <213> Camelus dromedarius

<400> 7
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tatacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggaa 120
 tctgggggag gctcgggtgca gactggaggg tctctgaacc tctcctgtac agcttctggc 180
 ttcacgttta acgatcctga catgggctgg taccaccaat ctccagggac tgggtgcaaa 240
 ttagtctcag ccattagtag tgatggcact acatactatt cagactccgt gaagggccga 300
 tttatcatct ccagagacag caccaagaac actttgtatt tgttgatgaa caacctgaaa 360
 cctgctgaca cgtccatata ttactgtgca gccggtctgc cgcataccaa tccgggaaat 420
 tggaaagttg agcatcgttt atcgtcctgt tcgagagggg gccagaagaa acttggtggt 480
 tttggttact ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct cagcagggca ccaccatcac 540
 catcactaat ag 552

<210> 8
 <211> 531
 <212> DNA
 <213> Camelus dromedarius

<400> 8
 atggccttgt ggtacttggt caataaaagg agtcttggtg cagctgtcct tatacttggt 60
 gggctgttaa tgtgcaatat tcaaatgaca ggagctcagg ctgaggtgca gctggtggag 120
 tctgggggag gctcgggtgca ggctggagag tctctgacac tctcctgtcg agtgtctggg 180
 gacacttaca atgctaattc gaataattac tgcctagcct ggttccgcca ggttccaggg 240
 aaggaccgag agggagtcgc gattatttgt agtgggtgcaa ataaatcata ctacgccacc 300

ES 2 456 823 B1

```
tccgcaagg gacgattcac catctccctt gacagcgcca agacaacggt gattctactg      360
atgaacagcc tcaaagctga ggacacgggc aattacttct gtgcggcggg ggatgcagcg      420
acgcggtattt cagctggcgg cacagtttgg aatcagcatg ggtataacat ttggggccag      480
gggaccagg tcaccgtctc ctgagcaggg caccaccatc accatcacta a                    531
```

```
<210> 9
<211> 494
<212> DNA
<213> Camelus dromedarius
```

```
<400> 9
tggctttgtg gtacttggtc aataaaagga gtcttggtgc agctgtcctt atacttggtg      60
ggctgttaat gtgcaatatt caaatgacag gagctcaggc tgaggtgcag ctggtggagt      120
ctgggggagg ctcggtgcag gctggaggat ctctaagact cacctgtgcg cactctgaaa      180
atatccggat tacttgcttc atgggctggt accgccaggc tccaggggag gagcgcgagt      240
tggttgccac tattactaat ggtgcatga cttcctacat agacgccgtg aagggccgat      300
tcatcatctc ccaagactat gccaagaagg aggtatatct gcaaagacc agcctgacac      360
ctgaggacac ggccacgtat tactgtggca cccggaggcg gtacaatgat aattgcatac      420
ccggcttga tatctggggc caggggacc aggtcacctg ctcctcagca gggcaccacc      480
atcaccatca ctaa                                                              494
```

```
<210> 10
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
```

```
<400> 10
ggggcgcggg tctcaagctc aggctgaggt gcagctggtg gag                          43
```

```
<210> 11
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
```

```
<400> 11
ggggcgcggg tctcactgct gaggagacgg tgacctgggt                                40
```

```
<210> 12
<211> 3979
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

```
<220>
<223> Recombinant cloning plasmid
```

```
<400> 12
taacaattcg agctcgttac cgggcccccc ctgagctcg aagccgcggt gcgggtgccca      60
gggctgccc ttgggtctcc cgggcgcgta ctccacctca cccatctttt attacatggt      120
```

ES 2 456 823 B1

tgaacttcaa caatttatga ctttttgttc ttattgttgc aggtatggct ttgtggtact 180
 tgttcaataa aaggagtctt ggtgcagctg tccttatact tgttgggctg ttaatgtgca 240
 atattcaaat gacaggagct agagaccac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 300
 acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 360
 ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg 420
 cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga 480
 agggcgatcg gtgcgggcct cttcgtatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 540
 aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc 600
 cagtgaattc gagctcgga cccggggatc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct 660
 tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 720
 acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatac gtgagctaac 780
 tcacattaat tgcgttgctc tctactgccc ctttcagctc gggaaacctg tcgtgccagc 840
 tggggctctc gcagggcacc accatcacca tctaataag aagcttacta gagcgtggtg 900
 cgcacgatag cgcatagtgt ttttctctcc acttgaatcg aagagataga cttacggtgt 960
 aaatccgtag ggggtggcga aaccaaatta cgcaatgttt tgggttccat ttaaatacga 1020
 accccttatt tcttgatca cctgttaacg cacgtttgac gtgtattaca gtgggaataa 1080
 gtaaaagtga gaggttcgaa tcctccctaa ccccggtag gggcccagcg gccgctctag 1140
 ctagagtcaa gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 1200
 tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 1260
 taacatgtaa tgcgatgact ttttatgag atgggttttt atgattagag tcccgaatt 1320
 atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 1380
 cgcggtgtca tctatgttac tagatcgact gacaggatat attggcgggt aaactaagtc 1440
 gctgtatgtg tttgtttgag atctcatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1500
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1560
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 1620
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1680
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1740
 cagttcggtg taggtcgctt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 1800
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 1860
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcggtgc 1920
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 1980
 ctgctctctg ctgaagccag ttaccttcgg aagaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2040
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2100
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 2160
 aaactcacgt taagggattt tggctatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2220

ES 2 456 823 B1

tttaaattaa aatgaagtt ttaaataat ctaaagtata tatgtgtaac attggtctag 2280
 tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat caggattatc 2340
 aataccatat ttttgaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt 2400
 ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtccaa catcaataca 2460
 acctattaat ttcccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac 2520
 gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagttt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg 2580
 ccagccatta cgctcgtcat caaaatcact cgcatcaacc aaaccgttat tcattcgtga 2640
 ttgcgctga gcgagtcgaa atacgcgatc gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat 2700
 cgaatgcaac cggcgcagga aactgccag cgcatcaaca atattttcac ctgaatcagg 2760
 atattcttct aatacctgga atgctgtttt ccctgggatc gcagtgggtga gtaaccatgc 2820
 atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcgggaaga ggcataaatt ccgtcagcca 2880
 gtttagtctg accatctcat ctgtaacaac attggcaacg ctaccttgc catgtttcag 2940
 aaacaactct ggcgcacg gcttccata caatcggtag attgtcgcac ctgattgccc 3000
 gacattatcg cgagcccatt tataccata taaatcagca tccatgttgg aatttaatcg 3060
 cggccttgag caagacgttt cccgttgaat atggctcata acacccttg tattactggt 3120
 tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt ttatcttctg caatgtaaca 3180
 tcagagattt tgagacacia cgtggctttg ttgaataaat cgaacttttg ctgagttgaa 3240
 ggatcagatc acgcatcttc cggacaacgc agaccgttcc gtggcaaagc aaaagttcaa 3300
 aatcaccaac tggccacct acaacaagc tctcatcaac cgtggctccc tcactttctg 3360
 gctggatgat ggggagattc aggcgatccc catccaacag cccgccgctg agcgggcttt 3420
 tttatccccg gaagcctgtg gatagagggt agttatccac gtgaaaccgc taatgccccg 3480
 caaagccttg attcacgggg ctttccggcc cgctccaaaa actatccacg tgaaatcgt 3540
 aatcagggta cgtgaaatcg ctaatcggag tacgtgaaat cgctaataag gtcacgtgaa 3600
 atcgtaatc aaaaaggcac gtgagaacgc taatagccct ttcagatcaa cagcttgcaa 3660
 acaccctcg ctccggcaag tagttacagc aagtagtatg ttcaattagc ttttcaatta 3720
 tgaatatata tatcaattat tggtcgccct tggcttctgg acaatgcgct acgcgaccg 3780
 gctccgcccg tggacaaccg caagcggttg cccaccgctg agcggccagcg cttttgccc 3840
 caaccggcg gccggccgca acagatcgtt ttataaattt tttttttga aaaagaaaa 3900
 gcccgaaagg cggcaacctc tcgggcttct ggatttccga tccccggaat tagagatctt 3960
 ggcaggatat attgtggtg 3979