



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 374 343**

21 Número de solicitud: 201000347

51 Int. Cl.:
C07K 14/05 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **16.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2012

71 Solicitante/s: **PLANT PRINT DIAGNOSTICS, S.L.**
c/ Mayor, 25
46610 Guadassuar, Valencia, ES

72 Inventor/es: **Cambra Álvarez, Mariano;**
Gorris Grancha, María Teresa;
Boscia, Donato;
Esteban Tortajada, Olga;
Fernández Fernández, Rosario;
García Álvarez, Juan Antonio;
Candresse, Thierry y
Olmos Castelló, Antonio

74 Agente: **González Palmero, Fé**

54 Título: **Péptidos y uso de los mismos para la detección de aislados virales de PPV.**

57 Resumen:

Péptidos y uso de los mismos para la detección de aislados virales de PPV.

La presente invención se refiere a péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, el uso de dichos péptidos para la producción de anticuerpos anti-PPV o anti-PPV-M, y a un método para la detección e identificación de aislados de PPV en muestras obtenidas de plantas.

ES 2 374 343 A1

DESCRIPCIÓN

Péptidos y uso de los mismos para la detección de aislados virales de PPV.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo general de la diagnosis de enfermedades virales en plantas, en concreto se refiere a péptidos y uso de los mismos para la detección de aislados de *Plum pox virus* (PPV).

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de la sharka o viruela de los frutales de hueso es una enfermedad que afecta a las especies vegetales del género *Prunus*, causada por el virus fitopatógeno *Plum pox virus* (PPV), Familia *Potyviridae*, Género *Potyvirus* (García y Cambra, 2007. *Plant Viruses* 1 (1), 69-79). Esta enfermedad viral provoca daños de importancia económica especialmente en albaricoquero, ciruelo (europeo y japonés) y melocotonero. Las pérdidas directas e indirectas asociadas a la enfermedad se han estimado en más de 10.000 millones de euros en los últimos 30 años (Cambra *et al.*, 2006a. *Bull. OEPP/EPPO Bull.*, 36, 254-261).

PPV es un virus incluido en las listas de cuarentena de todos los países con una industria importante de *Prunus*. Se han descrito siete tipos de aislados de PPV: Dideron (D), Marcus (M), Recombinante entre D y M (REC), El Amar (EA), Cerezo (C), Winona (W) y Turco (T), entre los cuales los mayoritarios son D y M (OEPP/EPPO, 2004, [http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Plum_pox_virus/pm7-32\(1\)%20PPV000%20web.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Plum_pox_virus/pm7-32(1)%20PPV000%20web.pdf)). La biología y propiedades moleculares del virus han sido bien estudiadas y se conocen muchas funciones del genoma viral, que está secuenciado completamente (García y Cambra, 2007).

La enfermedad de la sharka fue descrita en Bulgaria en 1932 (Atanasoff, 1932, *Yearbook Univ. Sofia, Fac. Agricultura* 11, 49-69) y actualmente ha sido reportada en todos los países europeos, en muchos mediterráneos y de oriente próximo y medio. El virus además, ha sido detectado y descrito en América (Chile, Canadá, EEUU y Argentina) y en algunos países asiáticos (India, Pakistán, China y Kazajstán) (García y Cambra, 2007). El movimiento de material vegetal infectado, con o sin síntomas, ha sido y continúa siendo, la principal causa de dispersión del virus a larga distancia (Cambra *et al.*, 2006a). A más corta distancia el virus es transmitido de forma no persistente por diversas especies de pulgones, siendo los más importantes por su frecuencia y eficacia transmisora *Myzus persicae* y *Aphis spiraecola* (Labonne y Dallet, 2006, *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36, 267-270; Cambra *et al.*, 2006b, *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36, 271-275).

El control de PPV se efectúa tratando de impedir su introducción (entrada, instauración y dispersión) en zonas donde no está presente mediante sistemas de cuarentena. Cuando el virus se ha introducido en un país o zona y es técnicamente posible, se efectúan medidas de erradicación o exclusión de inóculo. En casos en los que las anteriores medidas no resulten posibles es necesario aplicar estrategias de convivencia basadas en el uso de material vegetal resistente, selección sanitaria que permita multiplicar únicamente material vegetal sano y realizar las plantaciones con material certificado como libre de PPV. Las estrategias basadas en resistencia serían las más durables y aconsejables, pero no existen fuentes de resistencia en otros *Prunus*, que pudieran ser transferidas de forma fácil mediante cruzamientos mejora clásica, aunque se están realizando diversos programas con esta finalidad (Capote *et al.*, 2006. A review of *Plum pox virus*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36, 201-349). Se están realizando esfuerzos para conseguir resistencia con la ayuda de métodos biotecnológicos (Scorza y Ravelonandro, 2006. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36, 337-340; García y Cambra, 2007). En todos estos procesos y estrategias de control son esenciales los métodos y protocolos de detección y diagnóstico del virus, que deben ser sensibles, específicos y fiables para garantizar resultados precisos. Además, los métodos utilizados deben tener capacidad de ser empleados a gran escala con extractos brutos de material vegetal, de forma que sean económicos y sencillos de uso.

La "European and Mediterranean Plant Protection Organization" (OEPP/EPPO) y la "International Plant Protection Convention" (IPPC) de la FAO, han recomendado distintos métodos biológicos, serológicos y moleculares para detección, diagnóstico y caracterización o identificación de PPV (OEPP/EPPO, 2004; IPPC, 2009, Annex to ISPM 27). Los métodos serológicos recomendados en los protocolos internacionales, basados en la técnica ELISA, son los más utilizados y convenientes (López-Moya *et al.*, 2000, *Journal of Biotechnology* 76, 121-136; Cambra *et al.*, 2006c, *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 36, 254-261; García y Cambra, 2007) e incluso los más precisos y específicos si son utilizados con anticuerpos monoclonales específicos (Capote *et al.*, 2009, *Internacional Microbiology* 12, 1-6).

Se han producido diferentes anticuerpos policlonales de PPV, que están disponibles comercialmente, pero suelen presentar graves problemas de especificidad; por ello, se tiende a utilizar anticuerpos monoclonales específicos (Cambra *et al.*, 2006c). En la cita anterior se recogen los distintos anticuerpos monoclonales específicos de PPV producidos hasta ahora. Entre ellos un anticuerpo de isotipo IgG₁, Kappa, denominado 5B-IVIA, ha sido validado internacionalmente y es el único que representa a un epítipo universal de PPV pero a su vez específico del virus (Cambra *et al.*, 1994. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 24, 569-577; Candresse *et al.*, 1998a. *Phytopathology* 88,198-204; Candresse *et al.*, 1998b. *Acta Horticulturae* 472, 461-468; Cambra *et al.*, 2006c; Capote *et al.*, 2009). La región de unión de este anticuerpo a la cápsida de PPV ha sido erróneamente descrita por Candresse *et al.*, 1998b), como asociada a las posiciones de aminoácidos 72-89 de la cápsida (CP) de PPV.

Sin embargo, en la presente invención se ha determinado con exactitud y completa precisión, la verdadera secuencia de aminoácidos del epítipo de 5B-IVIA, denominada 5B-IVIA/AMR Lab identificada como SEQ ID NO: 1, de peso molecular (MW) 2.005,04 daltons que incluye la región restringida de unión (posición 94-100 de aminoácidos de la CP de PPV). La secuencia de este epítipo único, presente en todos los aislados y tipos de PPV hasta ahora descritos, se ha determinado con certeza y es uno de los objetos de la presente invención junto con otras posibles aplicaciones de la misma. Su uso permitió generar anticuerpos convencionales (policlonales de antisueros “monoespecíficos” y anticuerpos monoclonales específicos) (Harlow and Lane, 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y anticuerpos recombinantes de cualquier clase (Hollinger y Hudson, 2005. *Nature Biotechnology* 23, 1126-1136) específicos de PPV al clonar y expresar los genes de anticuerpos generados inmunizando con dicho epítipo.

Se han obtenido anticuerpos recombinantes, en el caso de PPV, únicamente frente a proteínas estructurales de aislados no transmisibles por pulgón, tipo NAT, y contra la RNA NIb replicasa viral (proteína no estructural) (Esteban *et al.*, 2003, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 167-175; Gil *et al.*, 2004, *Acta Horticulturae* 657,341-347; Gil *et al.*, 2006, *Actas de Horticultura SECH* 45, 227-228). Todavía no se ha empleado el epítipo o secuencia de aminoácidos objeto de la presente invención para producir anticuerpos recombinantes capaces de reconocer a cualquier aislado de PPV. Asimismo, el uso de esta secuencia concreta permitió generar anticuerpos monoclonales específicos, mediante la tecnología de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975, *Nature* 256, 495-497), capaces de reaccionar con aislados de PPV de cualquier tipo, ya que la secuencia de aminoácidos de 5B-IVIA/AMR Lab (SEQ ID NO: 1) objeto de la presente invención, representa una proteína conservada en todos los aislados de PPV y por lo tanto, universal en PPV.

Por otro lado, los tipos PPV-M poseen una epidemiología muy peculiar ya que se dispersan con facilidad entre cualquier especie de *Prunus*, causando graves daños económicos a la industria de todos los frutales de hueso y particularmente en melocotonero (especie difícilmente infectada naturalmente por otros tipos de PPV). Los métodos de diagnóstico y caracterización o identificación de PPV-M son de gran interés para poder tomar decisiones de erradicación o supresión de inóculo ante este aislado agresivo.

Los protocolos internacionales, recomiendan métodos serológicos y moleculares para la identificación de aislados PPV-M (OEPP/EPPPO, 2004; IPPC, 2009). Los métodos moleculares son más precisos y fiables, pero de difícil aplicación masiva y rutinaria a miles de muestras (López *et al.*, 2006. 1-46. *In: Molecular Diagnosis. Current Technology and Applications*. Horizon Scientific Press; Olmos *et al.*, 2007. 227-249. *In: Biotechnology and plant disease management*. CABI Press), por ello, los métodos serológicos basados en la técnica ELISA, suponen una interesante alternativa para la identificación selectiva de PPV-M (OEPP/EPPPO, 2004; Cambra *et al.*, 2006c).

El anticuerpo monoclonal AL, descrito como específico de PPV-M (Boscia *et al.*, 1997. *European Journal of Plant Pathology* 103, 447-480) es capaz de reconocer específicamente y con alta avidez a aislados M y REC de PPV, ya que estos últimos contienen la cápsida de M con algunos cambios de aminoácidos en la parte amino terminal, comparando con el tipo M verdadero (Salamon y Palkovics, 2002. *European Journal of Plant Pathology* 108, 903-907; Glasa *et al.*, 2004. *Journal of General Virology* 85, 2671-2681; Glasa *et al.*, 2005. *Archives of Virology* 150, 2051-2060). No obstante, estos anticuerpos AL han sido y son utilizados comercialmente para identificación de PPV-M con gran eficacia (Candresse *et al.*, 1998a).

La secuencia de este epítipo denominada AL-M/AMR Lab (SEQ ID NO: 2), presente en todos los aislados tipo PPV-M y PPV-REC hasta ahora descritos, se ha determinado (SEQ ID NO: 2) con precisión, siendo su peso molecular de 3.904,32 daltons. Esta secuencia es otro de los objetos de la presente invención junto con distintas aplicaciones posibles de la misma. Su uso permitió generar anticuerpos policlonales (antisueros) “monoespecíficos”, otros anticuerpos monoclonales específicos o anticuerpos recombinantes de cualquier clase específicos de PPV-M y REC, aptos para la detección, caracterización e identificación o para inmunomodular la infección viral una vez expresados en plantas transgénicas.

Además de las aplicaciones hasta ahora realizadas con anticuerpos para detectar, diagnosticar o identificar tipos de PPV, existen otras aplicaciones de secuencias de aminoácidos que constituyan un epítipo. En efecto, las técnicas de biología molecular permiten la expresión y el uso de proteínas de fusión deladoras. La secuencias de aminoácidos descritas en esta patente de invención, una vez expresadas, constituyen excelentes dianas para ser detectadas mediante serología con los anticuerpos ya existentes, o con otros producidos o generados con péptidos sintéticos o con proteína expresada en bacterias, levaduras, fagos, plantas o animales transgénicos.

La presente invención proporciona péptidos que permiten la detección y diagnóstico específico de PPV y PPV-M tipo Marcus. Además de que dichos péptidos constituyen una herramienta para detectar, seleccionar o reconocer específicamente a dianas marcadas con dichos epítipos o poder conferir resistencia en plantas transgénicas que los expresen o expresen anticuerpos recombinantes generados con ellas.

65 Descripción de la invención

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos identificadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

ES 2 374 343 A1

En un aspecto más en particular de la presente invención el péptido de aminoácidos Arg-Asp-Arg-Asp comprendido en la secuencia SEQ ID NO: 1 actúa como péptido marcador.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2 para la producción de anticuerpos anti-PPV (*Plum pox virus*) y anti PPV-M (*Plum pox virus* tipo Marcus). En un aspecto más en particular, los anticuerpos son anticuerpos policlonales, en otro aspecto en particular, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto más en particular, los anticuerpos son anticuerpos recombinantes.

10 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el vector de expresión descrito en la presente invención.

15 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una planta transgénica que comprende el vector de expresión descrito en la presente invención.

20 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección e identificación de aislados de PPV en muestras obtenidas de plantas o artrópodos mediante el uso de anticuerpos anti-PPV o anticuerpos anti-PPV-M descritos en la presente invención. En un aspecto más en particular, los anticuerpos utilizados son anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes. En un aspecto más en particular, el péptido de aminoácidos Arg-Asp-Arg-Asp comprendido en la secuencia SEQ ID NO: 1 actúa como péptido marcador de cualquier tipo de anticuerpos, incluyendo a los recombinantes. En un aspecto más en particular, la detección e identificación de aislados de PPV se realiza mediante técnicas inmunológicas.

Descripción de las figuras

30 La figura 1 muestra la ausencia de reacción en la carrera 4 correspondiente a planta control sana y la presencia de las típicas bandas de reacción en todos los aislados ensayados, seleccionados por su diversidad y secuencia más divergente respecto a los aislados PPV tipo. En la membrana A se observa la reacción frente a inmunoglobulinas policlonales de un antisuero control comercial anti-PPV (REAL-Durviz, Valencia), en las membranas B y C se presentan las reacciones frente a inmunoglobulinas policlonales de antisueros obtenidos con el péptido universal AMR Lab y la proteína expresada, respectivamente.

35 La figura 2, muestra algunos ejemplos de inmunolectrotransferencia tras tratamientos enzimáticos con glutamina C (Glu-C), lisina (Lys-C) y tripsina (Trip), respectivamente. Las carreras 1 a 9 corresponden a los aislados de PPV: RB-Mp, W, PS, RR, Ms, RB, 3.3RB, NAT y 5.15 de la colección de referencia del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carrera 10: enzima ensayada.

La figura 3 muestra la construcción del vector binario para transformación genética de plantas.

45 La figura 4 muestra una membrana de nitrocelulosa con una hoja impresa de *Nicotiana benthamiana* transgénica, con resultados positivos, reconocibles por la presencia de acúmulos o precipitados en los sitios de acumulación y expresión mayoritaria del fragmento de anticuerpo recombinante (formato scFv) 3DF1scFv-RDRD, específico de *Citrus tristeza virus* y detectado, mediante Inmunoimpresión-ELISA, gracias a la fusión de un péptido que es reconocido por el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA.

50 La figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápsida de *Plum pox virus*-PPV (SEQ ID NO: 1) mediante el programa informático "blastp" (protein-protein BLAST), de 100 aislados representativos de PPV depositados en las principales bases de datos (Genbank, EMBL y DDBJ). Los 20 aminoácidos implicados en la región de unión ("binding región") se encuentran en la posición 83-102 de aminoácidos de la secuencia de la cápsida de PPV para la mayoría de los aislados. Esta secuencia conservada, puede estar desplazada en su posición en algunos aislados.

55 La figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápsida de *Plum pox virus* tipo Marcus (PPV-M) (SEQ ID NO: 2) mediante el programa "blastp" ("protein-protein BLAST"), de 100 aislados representativos de PPV depositados en las principales bases de datos (Genbank, EMBL y DDBJ). Los 31 aminoácidos implicados en la región de unión ("binding región") pueden estar desplazados en su posición en algunos aislados PPV-M ó PPV-REC.

65

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

5 *Producción de anticuerpos policlonales universales, capaces de reconocer a cualquier tipo de Plum pox virus (PPV), utilizando péptidos sintéticos o proteínas de fusión expresadas en Escherichia coli*

1.1) Antígenos

10 Para la producción de anticuerpos policlonales se utilizaron como inmunógenos:

a) El péptido sintético SEQ ID NO: 1 (posición de los aminoácidos 83-102 de la proteína de cápsida de PPV en la mayoría de los aislados descritos, figura 5) de peso molecular (MW) 2.005,04 daltons conjugado a albúmina de suero bovino (BSA) activada según protocolo convencional de Lateef *et al.*, 2007 (J. Biomol. Tech., 18,173-176), y

15 b) El fragmento de la proteína de la cápsida de PPV (posición de aminoácidos 1 a 112) expresado como proteína de fusión a la proteína de unión maltosa (MBP o "maltosa binding protein") utilizando el plásmido pMCM10 clonado en *Escherichia coli* y purificado según Candresse *et al.*, 1998 (Acta Horticulturae 472,461-468).

20 1.2) Protocolo de inmunización

Los antígenos descritos previamente fueron utilizados para inmunizar hembras de conejo Californiano x Neozelandés de unos 2 kg de peso. La inmunización se realizó de forma convencional (Harlow and Lane, 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 726pp. ISBN:0-87969-314-2). La dosis de inmunización fue de 0,2 mg/mL de los antígenos en tampón fosfato salino pH 7,4 estéril. El protocolo de inmunización consistió en cuatro inyecciones intramusculares (con adyuvante incompleto de Freund v:v) y una inyección intravenosa en la vena marginal de la oreja. Las inyecciones intramusculares se efectuaron cada 10 días, transcurridos los cuales se inmunizó intravenosamente a los 15 días. Completado el protocolo de inmunización se realizó una primera toma de sangre para su titulación, tres días tras la última inyección intravenosa. Cuando el título fue superior a 1/10.000 en ELISA indirecto tapizando placas de poliestireno (Polisorp, Nunc) con una solución de 20 microgramos/m del péptido sintético o de la proteína de fusión en tampón carbonato pH 9,8, se procedió a la sangría total de los animales inmunizados (dos por cada antígeno). La sangre de los cuatro conejos se dejó coagular a temperatura ambiente durante 4 horas. El suero obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante conteniendo los anticuerpos (antisuero) se filtró estérilmente por filtro (Millipore) de 0,45 micras. El filtrado fue mezclado v:v con glicerol bidestilado estéril y mantenido a -80°C, en viales de crioconservación, hasta su uso.

40 1.3) Detección de cualquier aislado o tipo de PPV

El título (y la dilución de uso seleccionada) de los cuatro antisueros policlonales resultó en ELISA indirecto: 1) Antisuero PPV-péptido universal AMR Lab, conejo 1: 1/320.000, dilución de uso: 1/10.000, 2) idem que anterior, conejo 2: 1/160.000, dilución de uso: 1/10.000, 3) Antisuero PPV-proteína expresada AMR Lab, conejo 3: 1/160.000, dilución de uso: 1/5.000, 4) idem que anterior, conejo 4: 1/80.000, dilución de uso: 1/5.000.

45 Los anticuerpos, de cada antisuero, fueron purificados y empleados en diferentes técnicas serológicas:

a) ELISA-Doble sándwich de anticuerpos (DAS) (tapizado a 2 microgramos/mL de tampón carbonato, pH 9.6 y conjugados con la enzima fosfatasa alcalina a la dilución 1/5.000 en agua fisiológica tamponada, pH 7.4): todos los anticuerpos policlonales reconocieron a los 40 aislados de PPV de los diferentes tipos con los que se ensayó, con alta sensibilidad y con bajo ruido de fondo. La densidad óptica media (405 nm) de los dos antisueros (1 y 2) obtenidos de péptidos universales AMR Lab, frente a los 40 aislados de PPV (dos repeticiones en dos pocillos ELISA en dos placas diferentes), resultó: 3.520+/-0,120 tras 60 minutos de incubación del substrato p-nitro fenil fosfato a temperatura ambiente (el antisuero 1 proporcionó valores ELISA ligeramente superiores al antisuero 2). Las densidades ópticas medias frente a extracto de planta sana (*Nicotiana benthamiana* y melocotonero de semilla GF 305), fueron similares para ambos antisueros y plantas control: 0,184+/-0,022 tras 60 minutos de incubación del substrato como anteriormente. Los antisueros 3 y 4, obtenidos con proteína expresada en *E. coli*, proporcionaron densidades ópticas similares a las de los antisueros 1 y 2 para los distintos aislados de PPV (media 3.708+/-0,167), pero mostraron un ruido de fondo ligeramente superior frente a planta sana (0,202+/-0,028).

b) Western blot (inmuno-electrotransferencia) convencional realizado tras electroforesis con los aislados, véase Figura 1 adjunta: 1) SK68 (PPV-M), 2) Pd4 (PPV-Rec), 3) B1298 (PPV-Rec con una delección en la CP), y 4) extracto control sano de *Nicotiana benthamiana*, electrotransferencia a membranas de Immobilon-Sigma y revelado serológico mediante ELISA indirecto utilizando los antisueros 1 y 3 anteriores, a la dilución de uso (1/10.000 y 1/5.000, respectivamente) y como conjugado anticuerpos de cabra anti conejo (GAR-Sigma 1/5.000) marcados con fosfatasa alcalina. El revelado final se realizó con substrato precipitante SigmaFast (NBT+BCIP, Sigma) incubando 10 minutos a temperatura ambiente.

ES 2 374 343 A1

Ejemplo 2

Producción de anticuerpos monoclonales específicos de PPV (universales) y específicos de PPV-M, utilizando péptidos sintéticos

Para la producción de anticuerpos monoclonales se utilizaron como inmunógenos:

a) El péptido sintético SEQ ID NO: 1, de secuencia conservada en todos los aislados y tipos de PPV (posición de los aminoácidos 83-102 de la proteína de cápsida de PPV en la mayoría de los aislados descritos, figura 5) de peso molecular (MW) 2.005,04 daltons, conjugado a albúmina de suero bovino BSA activada según protocolo convencional de Lateef *et al.*, 2007 (J. Biomol. Tech., 18, 173-176), y

b) El péptido sintético SEQ ID NO: 2 de MW 3.904,32 daltons, cuya secuencia está conservada en los aislados tipo Marcus (PPV-M). El péptido se conjugó con BSA activada según protocolo convencional de Lateef *et al.*, 2007 (J. Biomol. Tech., 18, 173-176).

2.2) Protocolo de inmunización de ratones Balb/c

Se inmunizaron intraperitonealmente ratones Balb/c de 6 semanas de edad (dos ratones por cada péptido) a intervalos de diez días con 50 microgramos de péptido en PBS, de forma convencional (Harlow and Lane, 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 726pp. ISBN:0-87969-314-2). Se realizaron al menos tres inyecciones. Después de la tercera inyección se tomaron muestras de sangre para determinar el título mediante ELISA indirecto. En el caso de resultar superior a 1/100.000 se les aplicó un recuerdo con la misma dosis dos días antes de la fusión. Si el título no fue el deseado se continuó la inmunización hasta lograr el título óptimo para la fusión. El título se determinó mediante la técnica ELISA-indirecto tapizando placas Polisorp (Nunc) con 10 microgramos/mL de tampón carbonato para cada péptido.

2.3) Producción de hibridomas y selección de anticuerpos monoclonales

La producción de anticuerpos monoclonales anti los péptidos inyectados se realizó mediante la tecnología de hibridomas y el protocolo convencional de Köhler y Milstein, 1975 (Nature 256, 495-497). La selección de anticuerpos ("screening"), la producción de líquido ascítico y la purificación de inmunoglobulinas se realizó según Gorris *et al.*, 1994 (Applied and Environmental Microbiology 60, 2076-2085). El análisis de los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos se realizó mediante la técnica ELISA-indirecto tapizando placas de poliestireno Polisorp (Nunc) con 100 microlitros de una concentración de 10 microgramos/mL de cada péptido en tampón carbonato pH 9.6. Se consideró que el sobrenadante era positivo (se producía detección de anticuerpos de interés) cuando la densidad óptica (450 nm) resultó al menos tres veces la del control negativo. Se empleó un sistema basado en la enzima peroxidasa utilizando como conjugado anti especie anticuerpos de cabra anti ratón (GAR) (Sigma) a la dilución recomendada por el fabricante (1/5.000 en agua fisiológica tamponada, pH 7.4).

De una única fusión para cada inmunógeno empleado, se seleccionaron 8 sobrenadantes que reconocían al péptido sintético universal (5B-IVIA/AMR Lab, SEQ ID NO: 1) y 6 que reaccionaron frente a al péptido conservado en PPV-M (AL-M/AMR Lab, SEQ ID NO: 2). De ellos se seleccionaron, se clonaron por dilución límite y finalmente se obtuvieron dos clones segregantes de anticuerpos monoclonales para el péptido universal 5B-IVIA/AMR Lab (SEQ ID NO: 1), uno denominado 5B2-AMR Lab de isotipo IgG_{2a}, Kappa y otro IgG₁, Kappa denominado 5B-3AMR Lab. Para el péptido AL-M/AMR Lab, (SEQ ID NO:2), finalmente se obtuvieron tres anticuerpos monoclonales, denominados M1-AMR Lab, M2-AMR Lab y M3-AMR Lab, de isotipos IgM, IgG_{2a} e IgG₁, todos ellos Kappa, respectivamente. Aquellos denominados 5B2/AMR Lab y M2-AMR Lab, reaccionaron con mayor avidez frente a los diferentes aislados de PPV y PPV-M empleados.

2.4) Uso de los anticuerpos monoclonales 5B2/AMR Lab para detección específica de cualquier aislado de PPV y del M2-AMR Lab para caracterización o identificación específica de aislados PPV-M y REC

El comportamiento del anticuerpo monoclonal 5B2/AMR Lab (utilizado a 0,05 microgramos/mL) fue comparado con el de referencia internacional 5B-IVIA (utilizado a 0,1 microgramos/mL) mediante la técnica ELISA-DASI en las condiciones descritas por Cambra *et al.*, 1994 (Bull. OEPP/EPPPO Bull., 24, 569-577). El anticuerpo 5B2/AMR Lab obtenido reconoció a 105 aislados de PPV ensayados de distintos tipos en condiciones nativas (extractos de planta infectada preparados homogeneizando un peso de material vegetal en 20 mL de tampón de extracción PBS+0,2% DIECA+2%PVP-10, pH 7.2). Las densidades ópticas obtenidas con el mismo, fueron muy similares e indistinguibles de las obtenidas con el anticuerpo de referencia 5B-IVIA. La densidad óptica media (405 nm) del anticuerpo de referencia resultó, tras 60 minutos de incubación del sustrato a temperatura ambiente 2.723, mientras las del anticuerpo generado 5B2/AMR Lab fue de 2.802. La reacción frente a extractos de planta sana (*Nicotiana benthamiana* y melocotonero de semilla GF 305) también resultó muy similar: 0,188 y 0,175, respectivamente para 5B-IVIA y 5B2/AMR Lab. El anticuerpo 5B2/AMR Lab reconoció, mediante inmunoelectrotransferencia ("western blot", a fracciones de la CP de PPV tratadas, digeridas o desnaturalizadas con diferentes enzimas.

Ejemplo 3

Uso de la secuencia de aminoácidos RDRD como péptido marcador o delator para detección, mediante inmunopresión-ELISA, de anticuerpos recombinantes específicos de *Citrus tristeza virus*-CTV expresados en plantas transgénicas

3.1) Preparación del vector binario para transformación genética

El fragmento variable del anticuerpo recombinante (en formato de cadena simple variable o scFv) 3DF1scFv (GeneBank Accession number [AF162709](#)), específico de *Citrus tristeza virus*-CTV, se clonó en el vector pZIP1 según la metodología de Terrada *et al.*, 2000 (Phytopathology 90, 1337-1344). El 3DF1scFv se fusionó como señal delatora (o “tag”) al péptido RDRD (560,57 daltons), de la cápsida de PPV, para facilitar su detección mediante el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (Cambra *et al.*, 1994. Bull. OEPP/EPP Bull. 24, 569-577). Para ello, se añadió un único sitio de restricción *NotI* a un adaptador que combinó el epítipo RDRD y un sitio de restricción *Sall* (Upper primer RDRD1 SEQ ID NO: 3, y “lower primer” RDRD2, SEQ ID NO: 4), para generar el plásmido pZIP-3DF1-RDRD (Figura 3). El plásmido de clonado pMOG1?O(H/H) (Mogen International) también se modificó añadiendo un adaptador en el sitio de restricción *BamHI*, que incluyó los sitios de restricción *SfiI* y *Sall* (“Upper primer” *BamHI* SEQ ID NO: 5, y “lower primer” *BamHI* SEQ ID NO: 6) para generar el plásmido denominado pMOG180SS. De esta forma este módulo de expresión (o “cassette”) de expresión del plásmido adaptado pMOG180SS fue flanqueado con sitios de restricción *HindIII* y contuvo: 1) el promotor 35SCaMV (35Sp), 2) la secuencia líder RNA4 de *Alfalfa mosaic virus* (ALMV), 3) sitios de restricción para el clonado, *BamHI*, *SfiI* y *Sall*, y 4) la secuencia de finalización del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (NOST) (Figura 3).

El 3DF1scFv-RDRD se escindió de pZIP-3DF1-RDRD por digestión con *SfiI* y *Sall* y se clonó en los sitios *SfiI*-*Sall* de pMOG180SS.

Este módulo de expresión se extrajo por digestión con *HindIII* y se clonó en orientación invertida dentro del plásmido binario pBin19-sgfp, para generar pBin19-sgfp-scFv/3DF1 (Fig. 3). El plásmido resultante se incorporó, por electroporación, en la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

3.2) Transformación genética de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Se obtuvieron plantas transgénicas de *N. benthamiana* mediante el procedimiento descrito por Benvenuto *et al.*, 1991 (Plant Mol. Biol. 17:865-874.) y Horsch *et al.*, 1985 (Science 227:1229-1231), utilizando *A. tumefaciens*/pBin19-sgfp-scFv/3DF1. El éxito de la transformación se confirmó mediante observación de fluorescencia (GFP) bajo luz UV y la expresión de scFv3DF1 se comprobó indirectamente por detección serológica del péptido fusionado RDRD, mediante inmunopresión-ELISA.

3.3) Inmunopresión-ELISA directa para detección de 3DF1scFv fusionados al péptido RDRD

El anticuerpo 3DF1scFv-RDRD expresado en plantas de *Nicotiana benthamiana* fue reconocido con ayuda del anticuerpo 5B-IVIA, específico de PPV. En efecto, el péptido fusionado como proteína delatora, permitió una sencilla detección basada en inmunopresión-ELISA, en las condiciones descritas por Terrada *et al.*, 2000, (Phytopathology 90, 1337-1344). Se emplearon membranas de nitrocelulosa (Plant Print Diagnostics) de 0,45 micras de poro que fueron impresas con secciones frescas de tallo y con hojas jóvenes de *N. benthamiana* transgénicas (que expresaban 3DF1scFv-RDRD). Estas últimas, fueron escachadas con ayuda de un cilindro de vidrio para permitir imprimir o dejar huella de toda la hoja en la nitrocelulosa. Se bloquearon con BSA 1% en PBS durante 16 h a 4°C. Tras eliminar la solución de BSA, se añadieron anticuerpos 5B-IVIA conjugados con fosfatasa alcalina (a dosis de 0,05 microgramos/mL de PBS) y se dejaron incubar a 35°C durante tres horas. Se lavó la membrana abundantemente con PBS+Tween 20 (tres lavados de 5 minutos cada uno) y se añadió el sustrato de fosfatasa alcalina precipitante SigmaFast (BCIP+NBT) (Sigma). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se paralizó la reacción por dilución con agua. Se secó la membrana y se observó mediante una lupa binocular a x5 aumentos.

ES 2 374 343 A1

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 2.

5 2. Péptido según la reivindicación 1, donde el péptido de aminoácidos Arg-Asp-Arg-Asp comprendido en la secuencia SEQ ID NO: 1 actúa como péptido marcador.

10 3. Uso del péptido según la reivindicación 1 para la producción de anticuerpos anti-PPV (*Plum pox virus*) y anti PPV-M (*Plum pox virus* tipo Marcus).

4. Uso del péptido según la reivindicación 3, donde los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

5. Uso del péptido según la reivindicación 3, donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales específicos.

15 6. Uso del péptido según la reivindicación 3, donde los anticuerpos son anticuerpos recombinantes.

7. Vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

20 8. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 7.

9. Planta transgénica que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7.

25 10. Método para la detección e identificación de aislados de PPV en muestras obtenidas de plantas o de artrópodos mediante el uso de anticuerpos anti-PPV o anticuerpos anti-PPV-M según las reivindicaciones 3-6.

11. Método para la detección e identificación de aislados de PPV según la reivindicación 10, donde los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

30 12. Método para la detección e identificación de aislados de PPV según la reivindicación 10, donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales específicos.

35 13. Método para la detección e identificación de aislados de PPV según la reivindicación 10, donde los anticuerpos son anticuerpos recombinantes.

14. Método para la detección e identificación de aislados de PPV según la reivindicación 13, donde el péptido de aminoácidos Arg-Asp-Arg-Asp comprendido en la secuencia SEQ ID NO: 1 actúa como péptido marcador para detección inmunológica o molecular.

40 15. Método para la detección e identificación de aislado de PPV según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, **caracterizado** porque la detección e identificación de aislados de PPV se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas.

45 16. Kit o estuche para la detección e identificación de aislados de PPV que comprende los péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

50 17. Kit o estuche para la detección e identificación de aislados de PPV que comprende los anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 3-6.

FIGURA 1

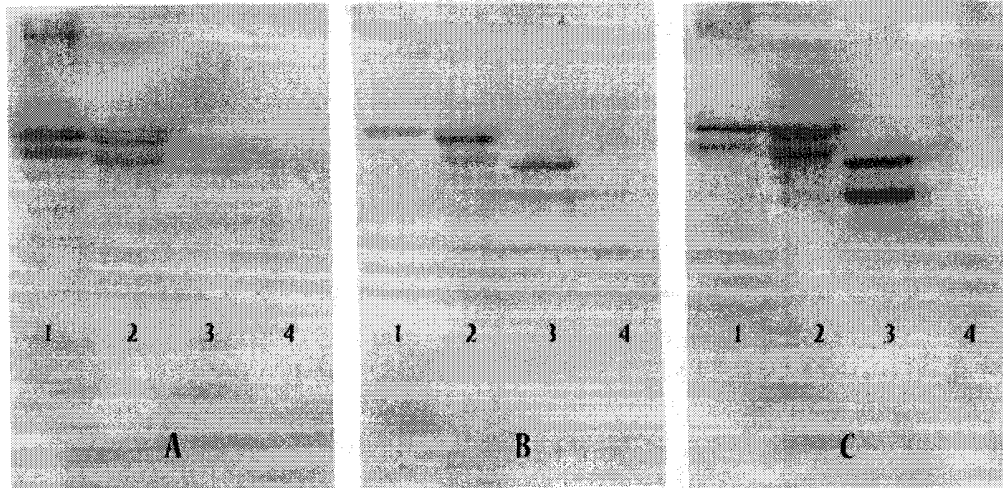


FIGURA 2

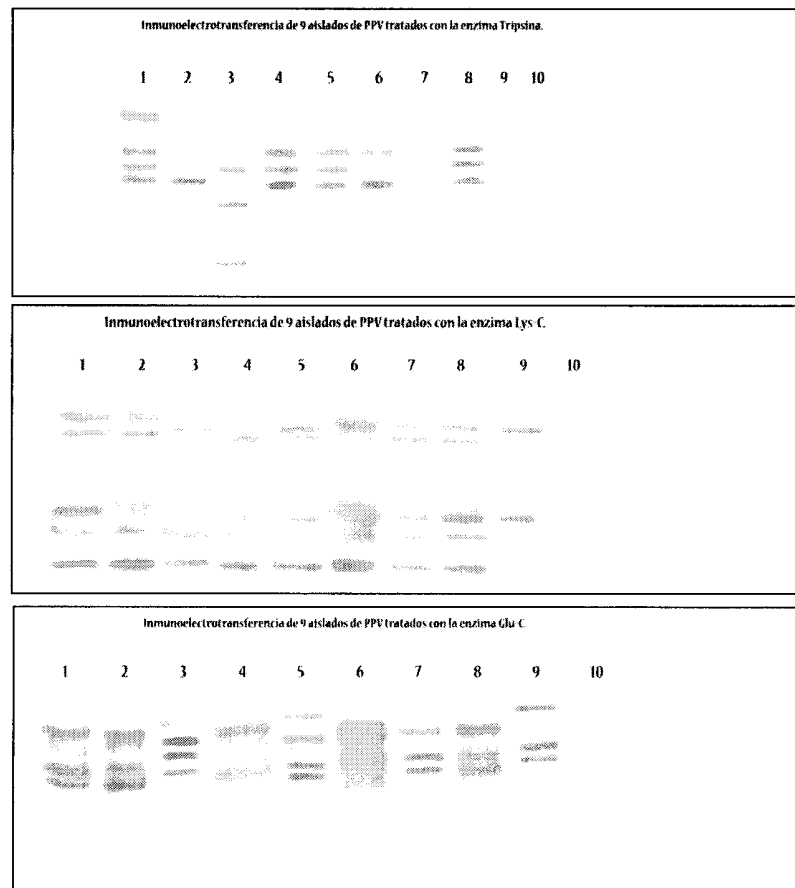


FIGURA 3

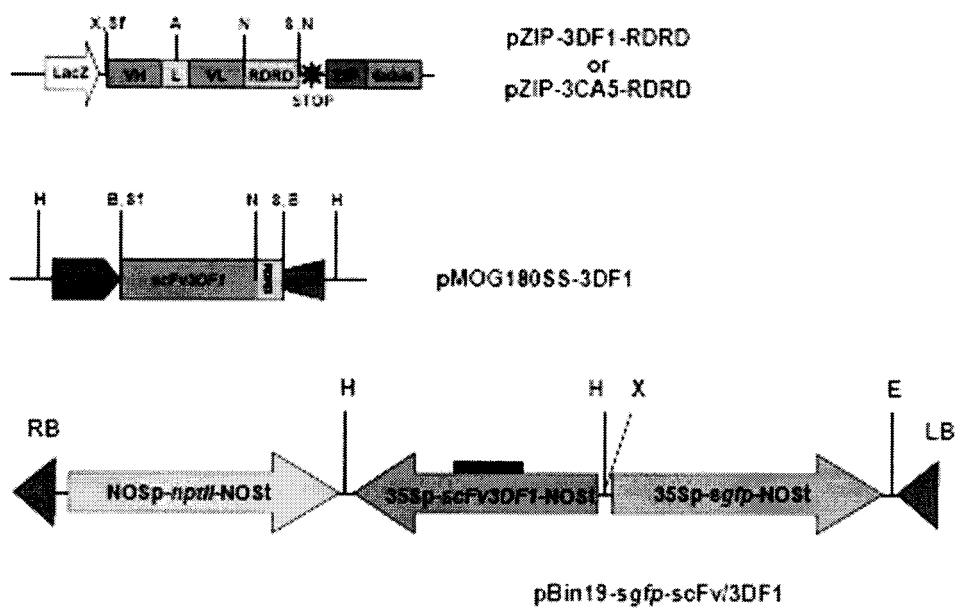


FIGURA 4

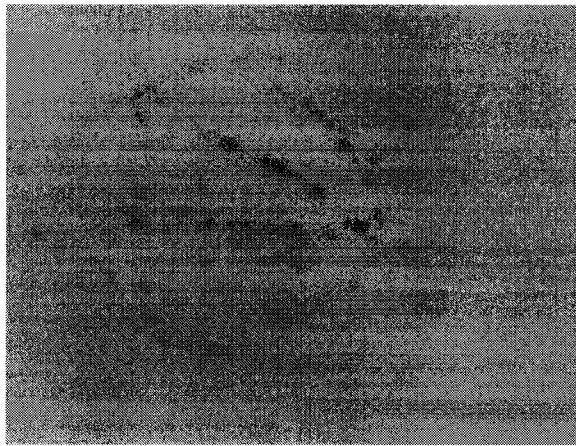


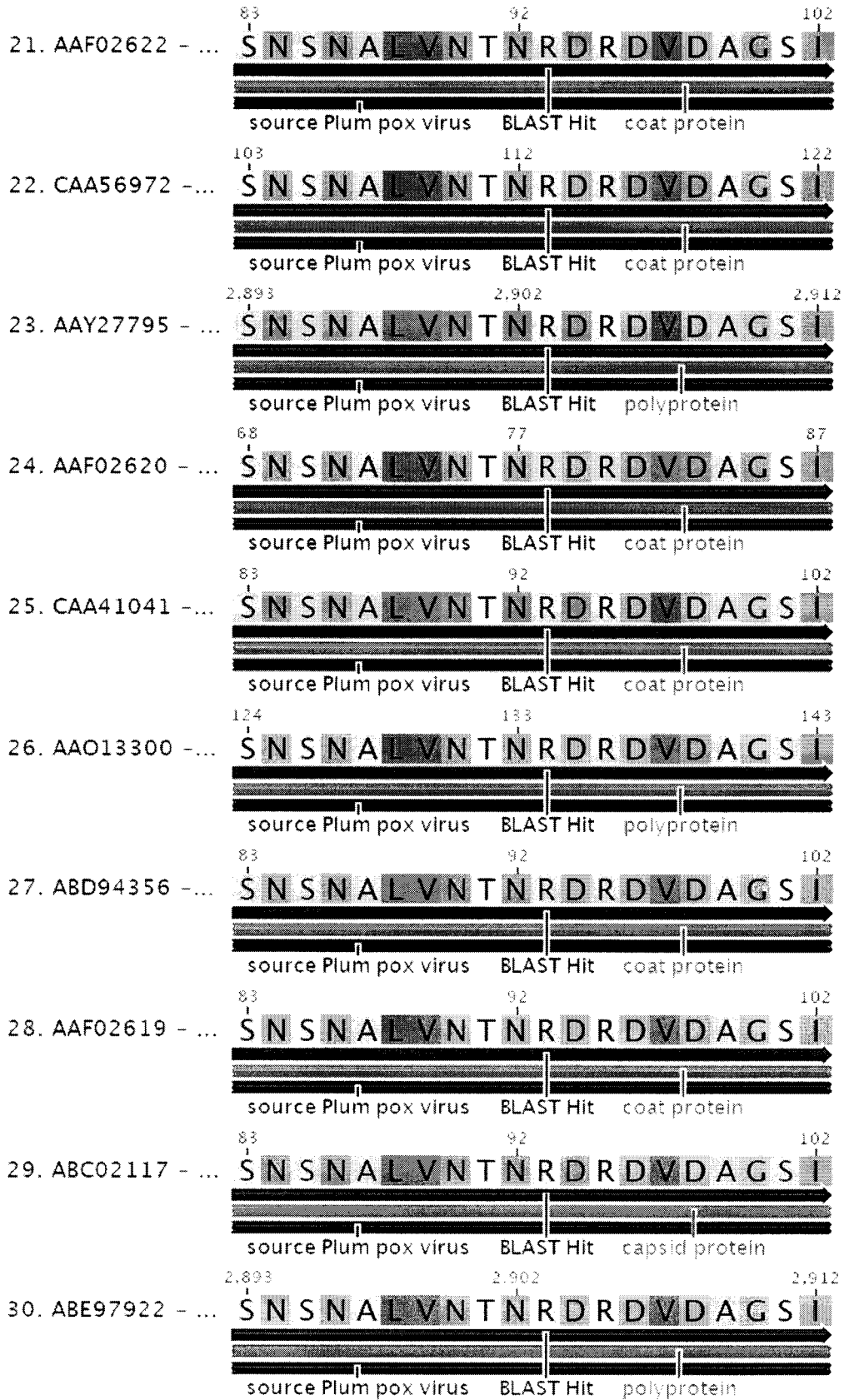
FIGURA 5



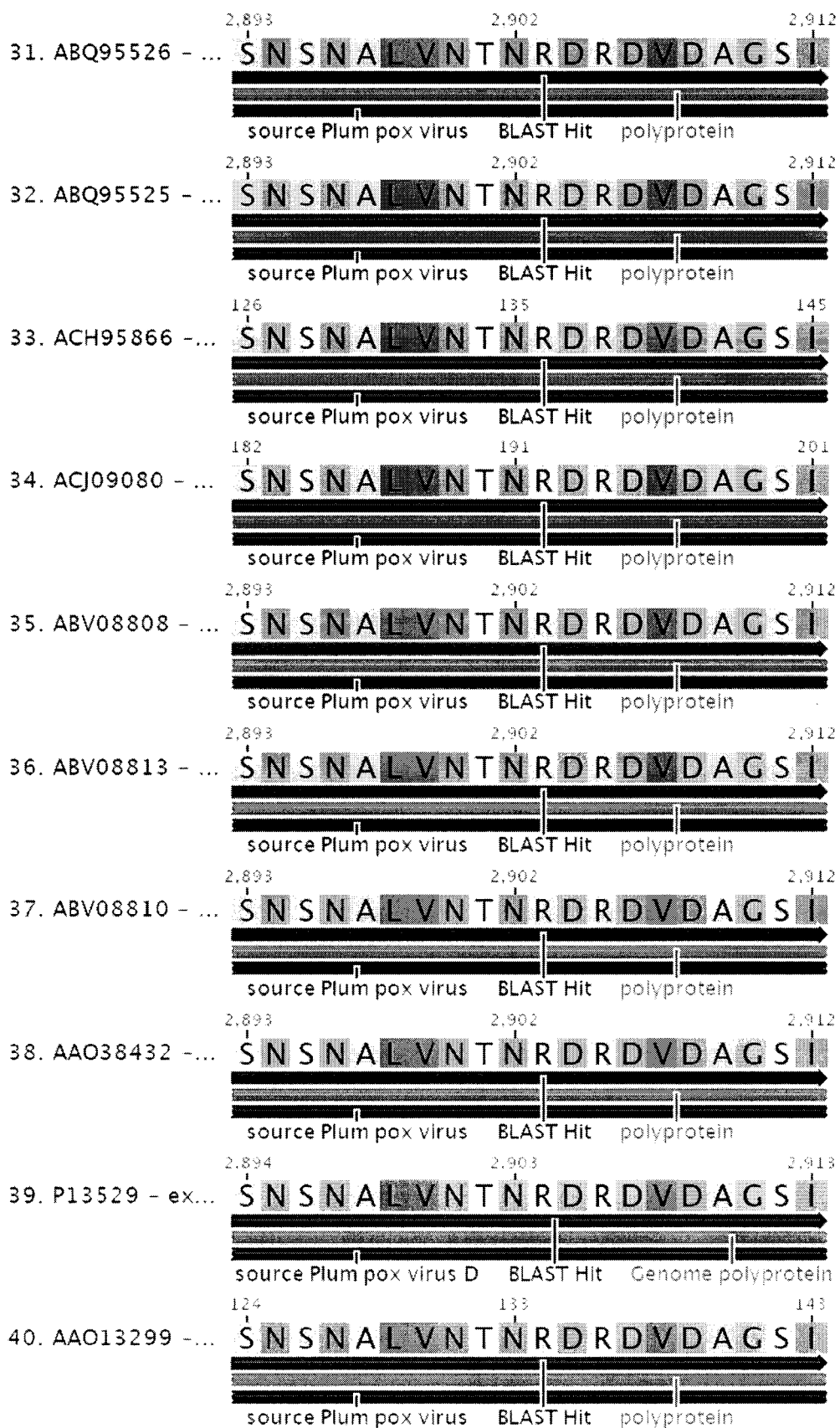
ES 2 374 343 A1



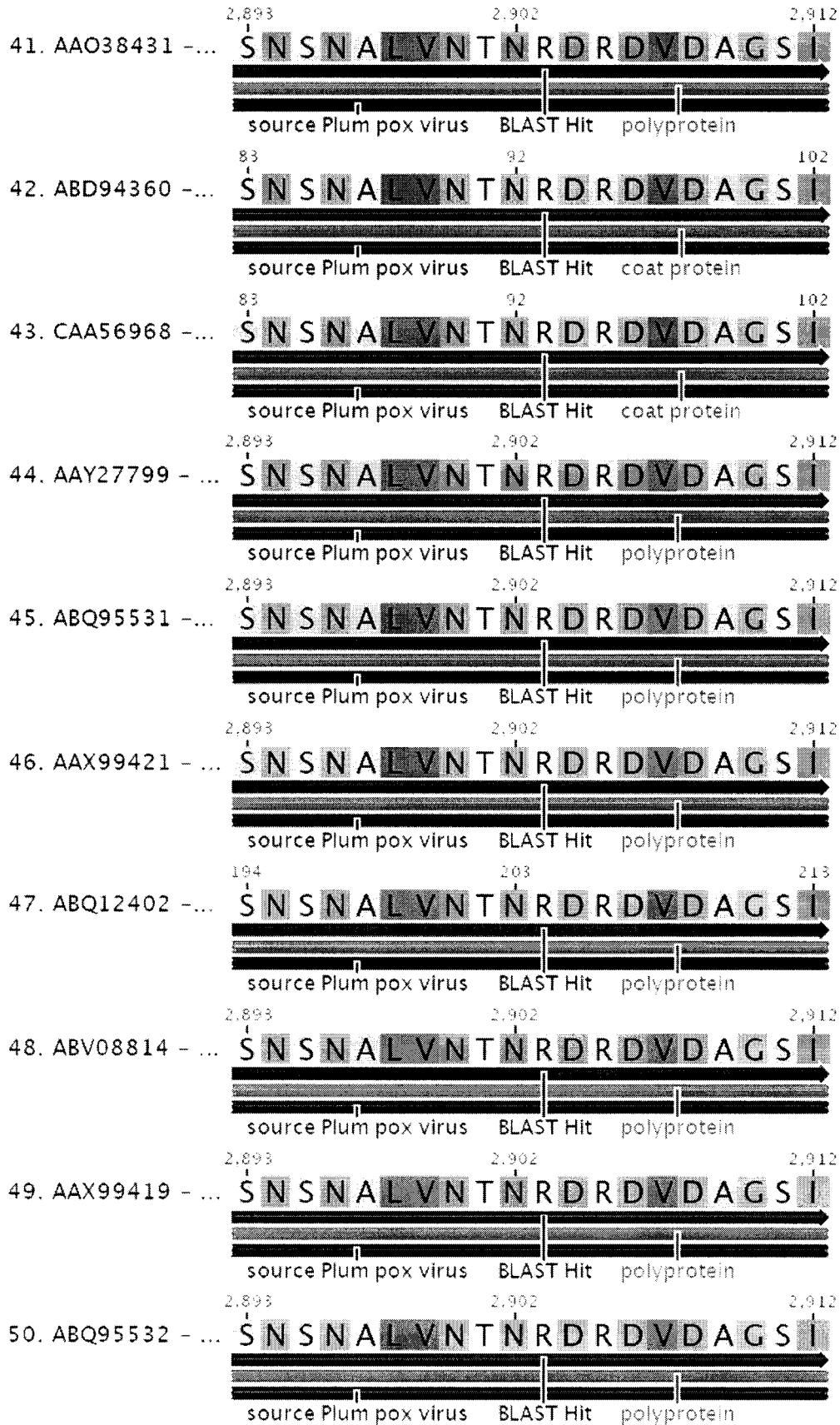
ES 2 374 343 A1



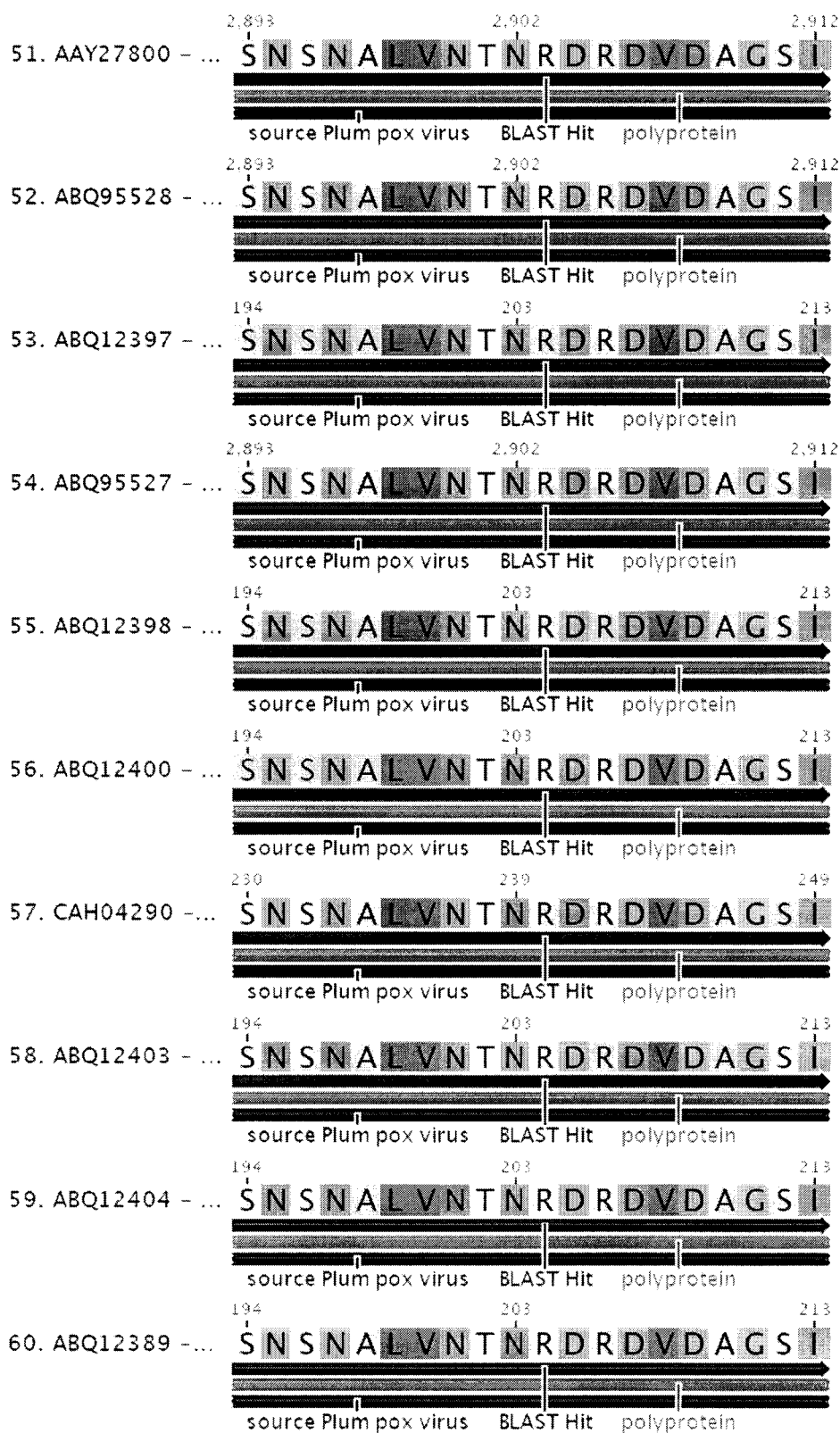
ES 2 374 343 A1



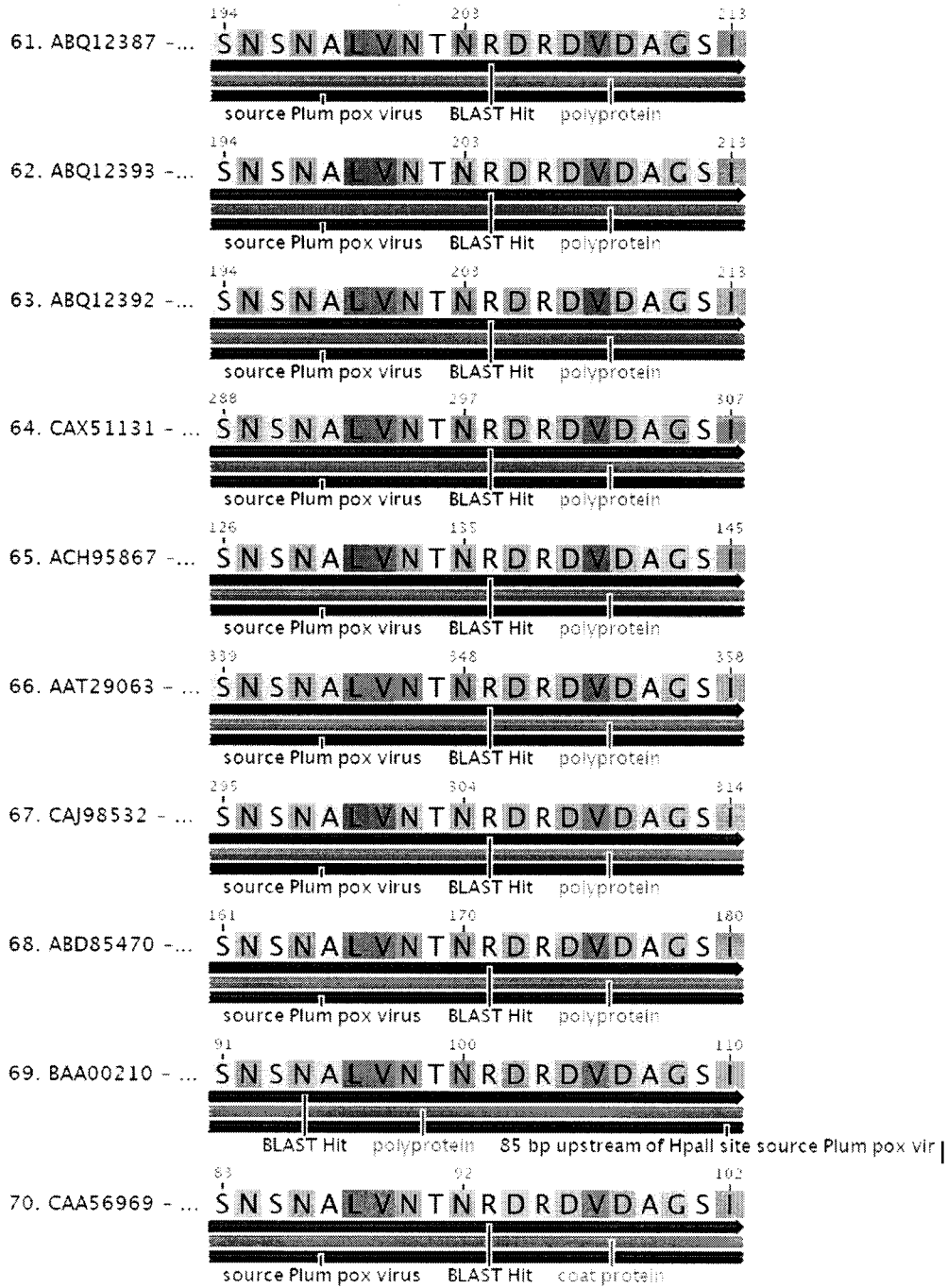
ES 2 374 343 A1



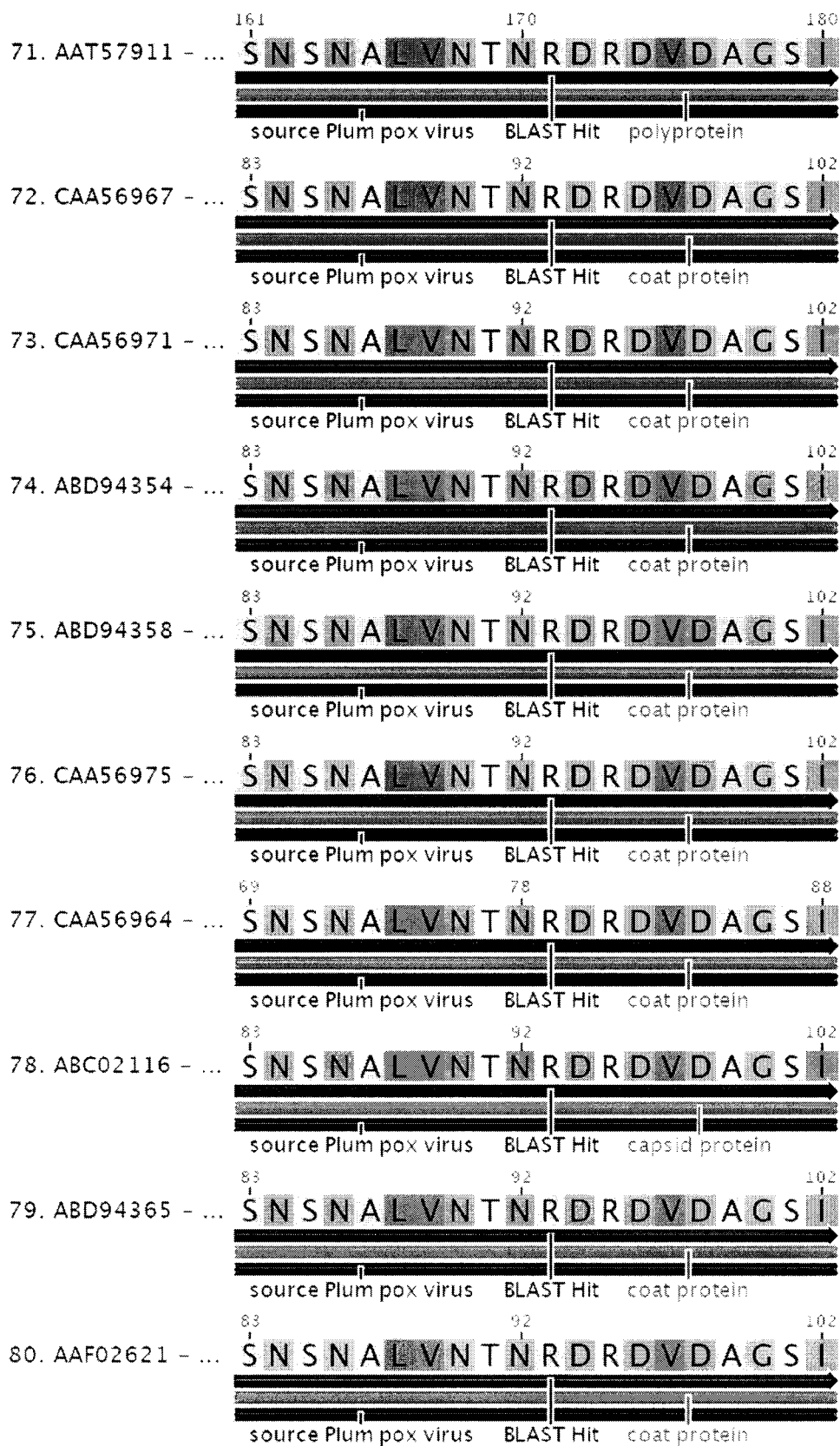
ES 2 374 343 A1



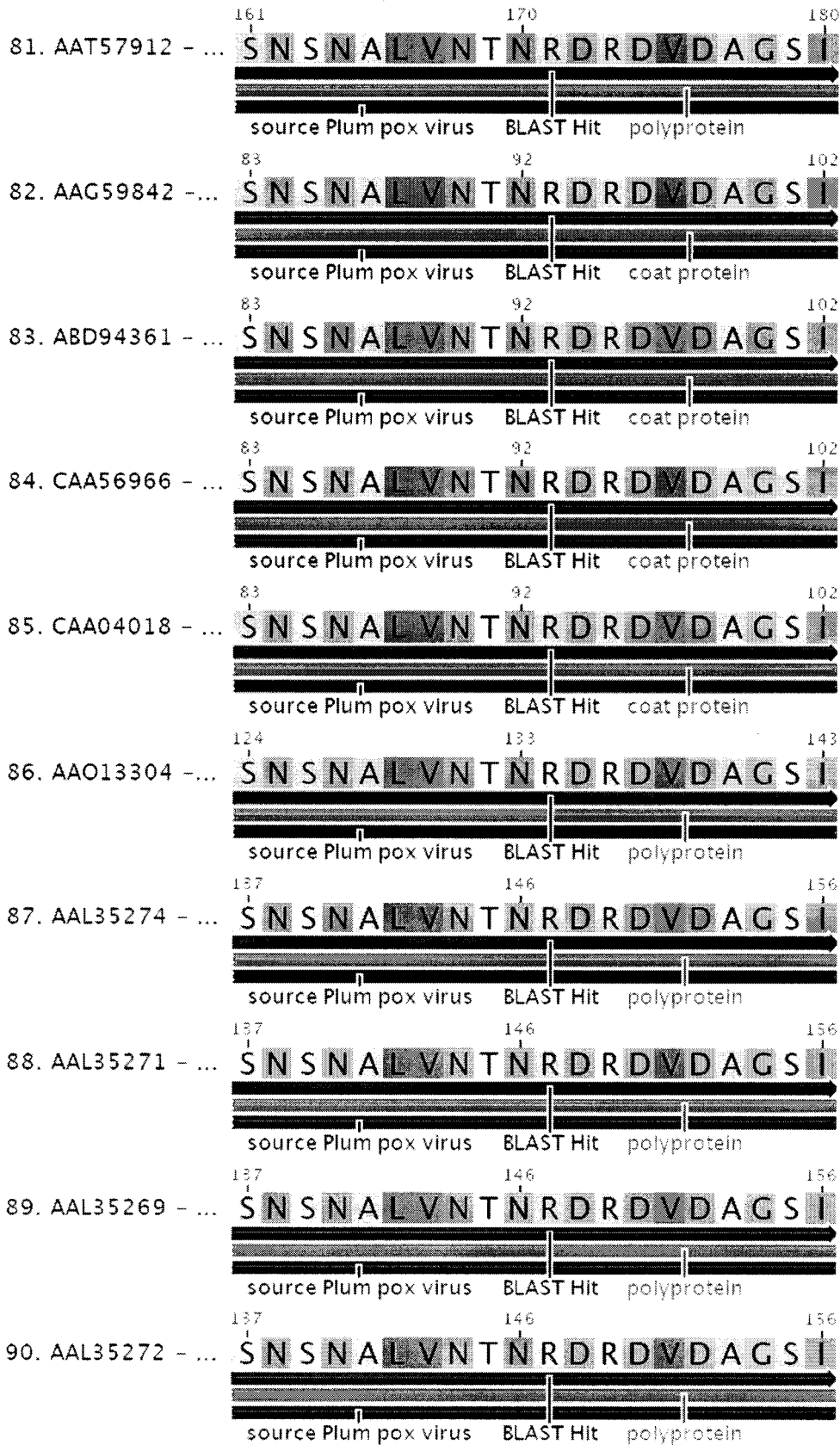
ES 2 374 343 A1



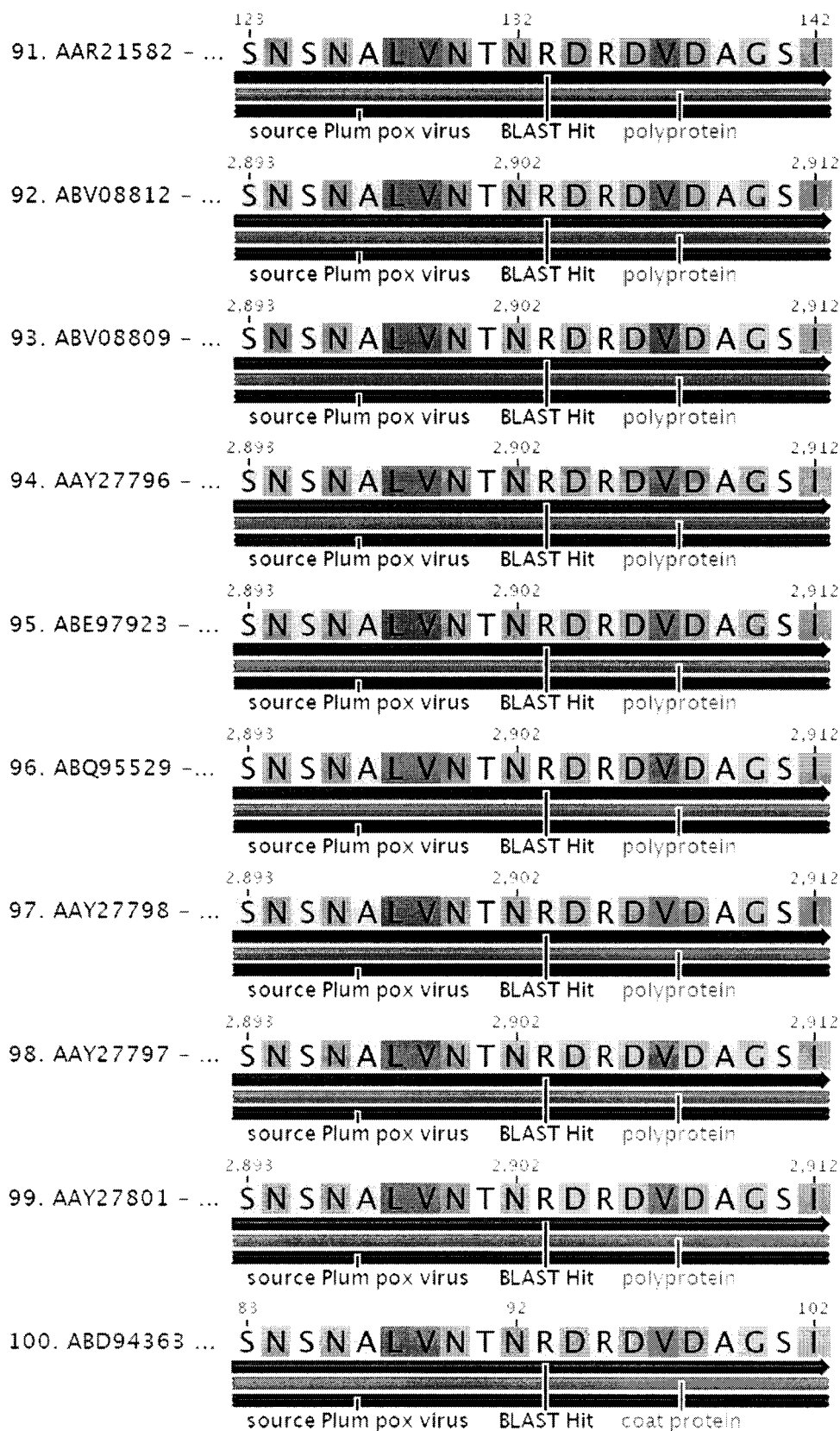
ES 2 374 343 A1



ES 2 374 343 A1



ES 2 374 343 A1

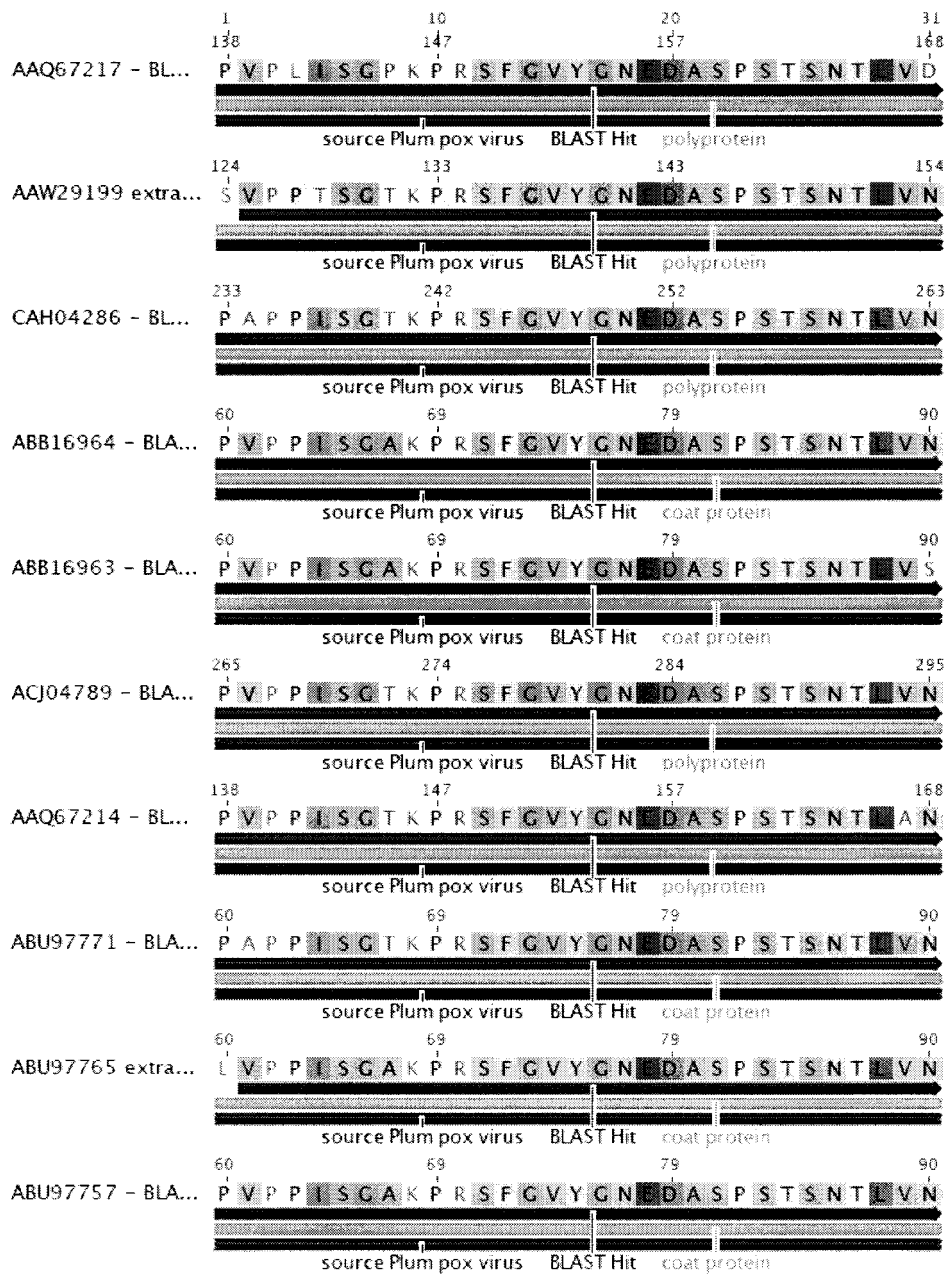


ES 2 374 343 A1

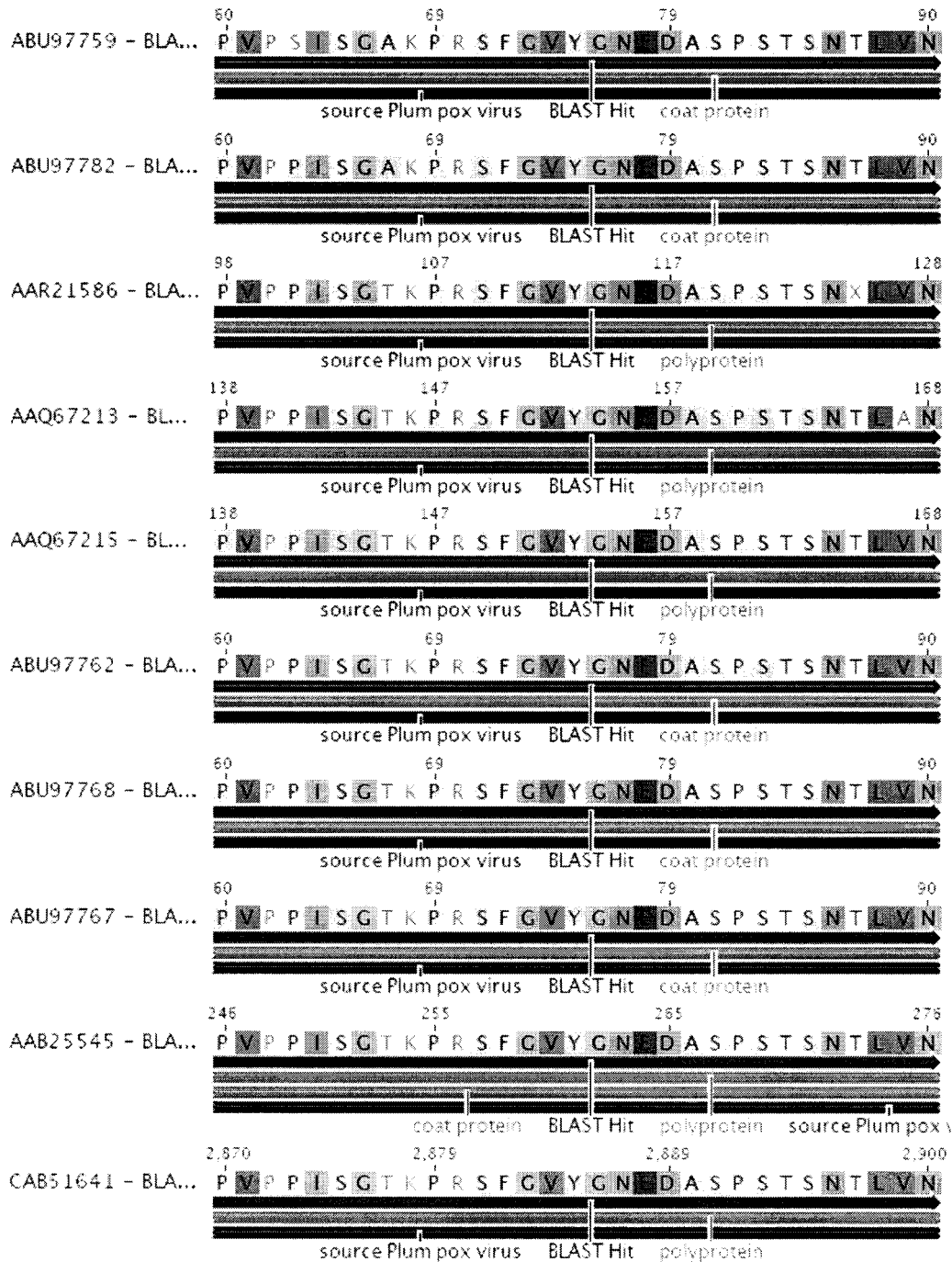
101. 5B

¹
S N S N A L V N T ¹⁰
N R D R D V D A G S ²⁰
I

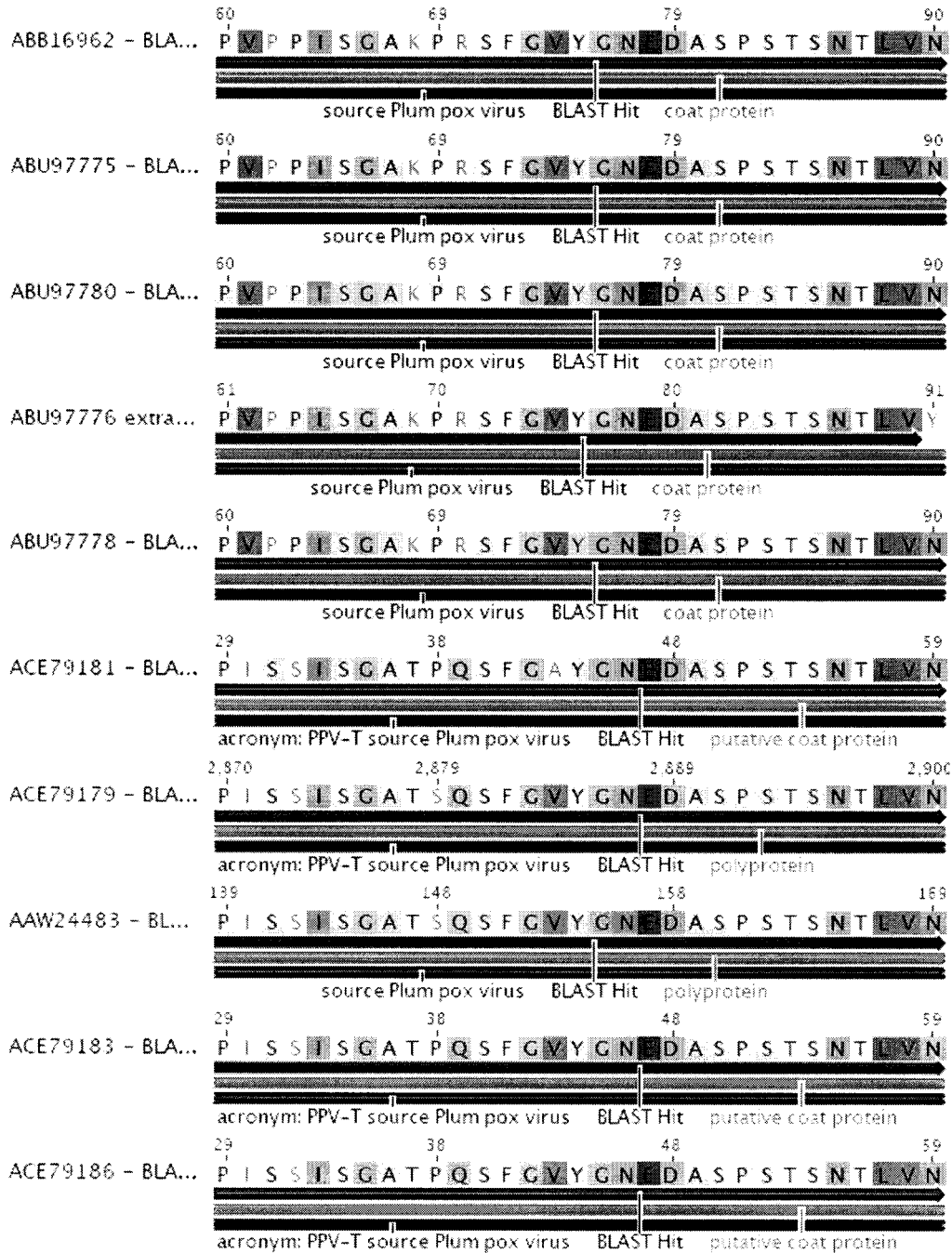
FIGURA 6



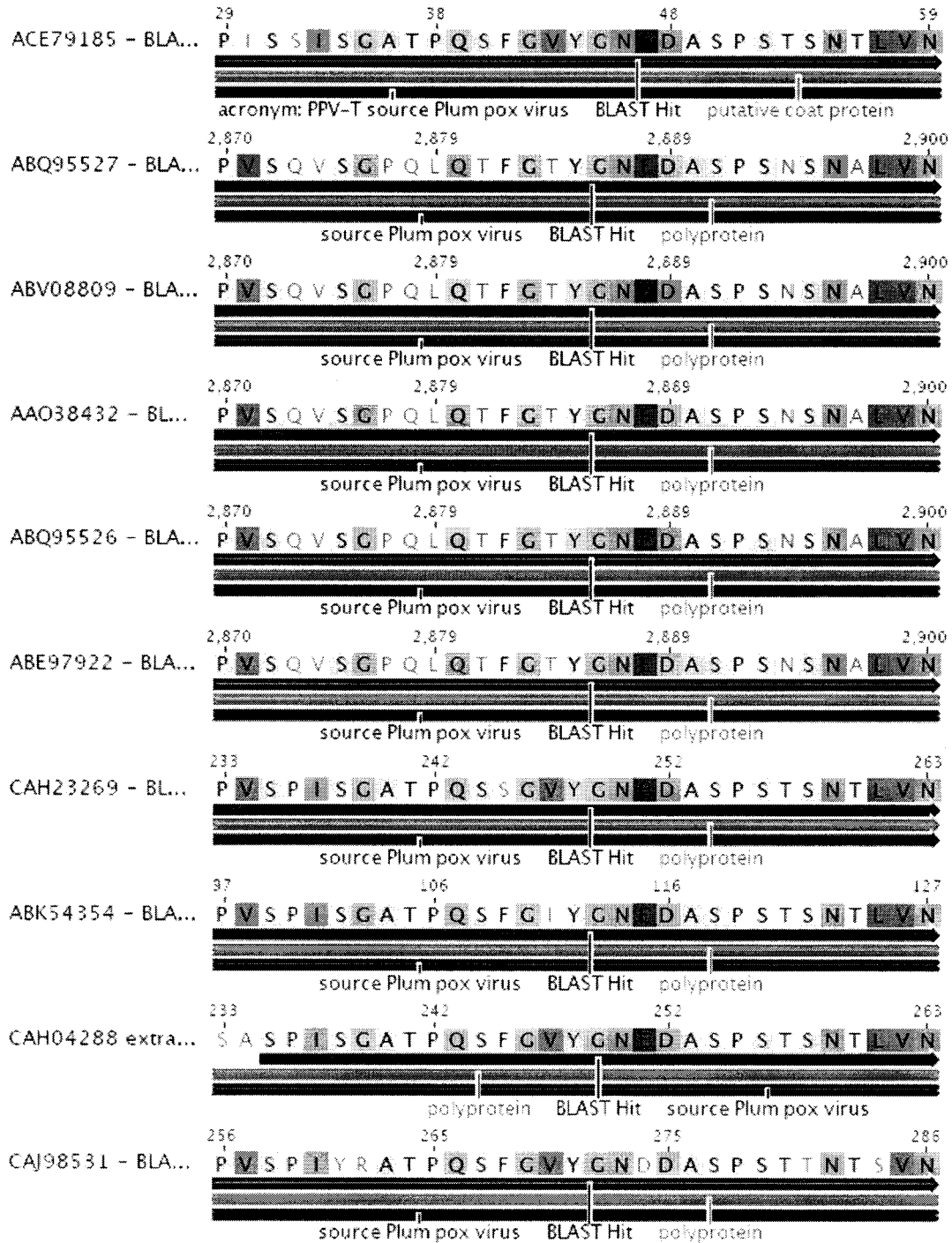
ES 2 374 343 A1



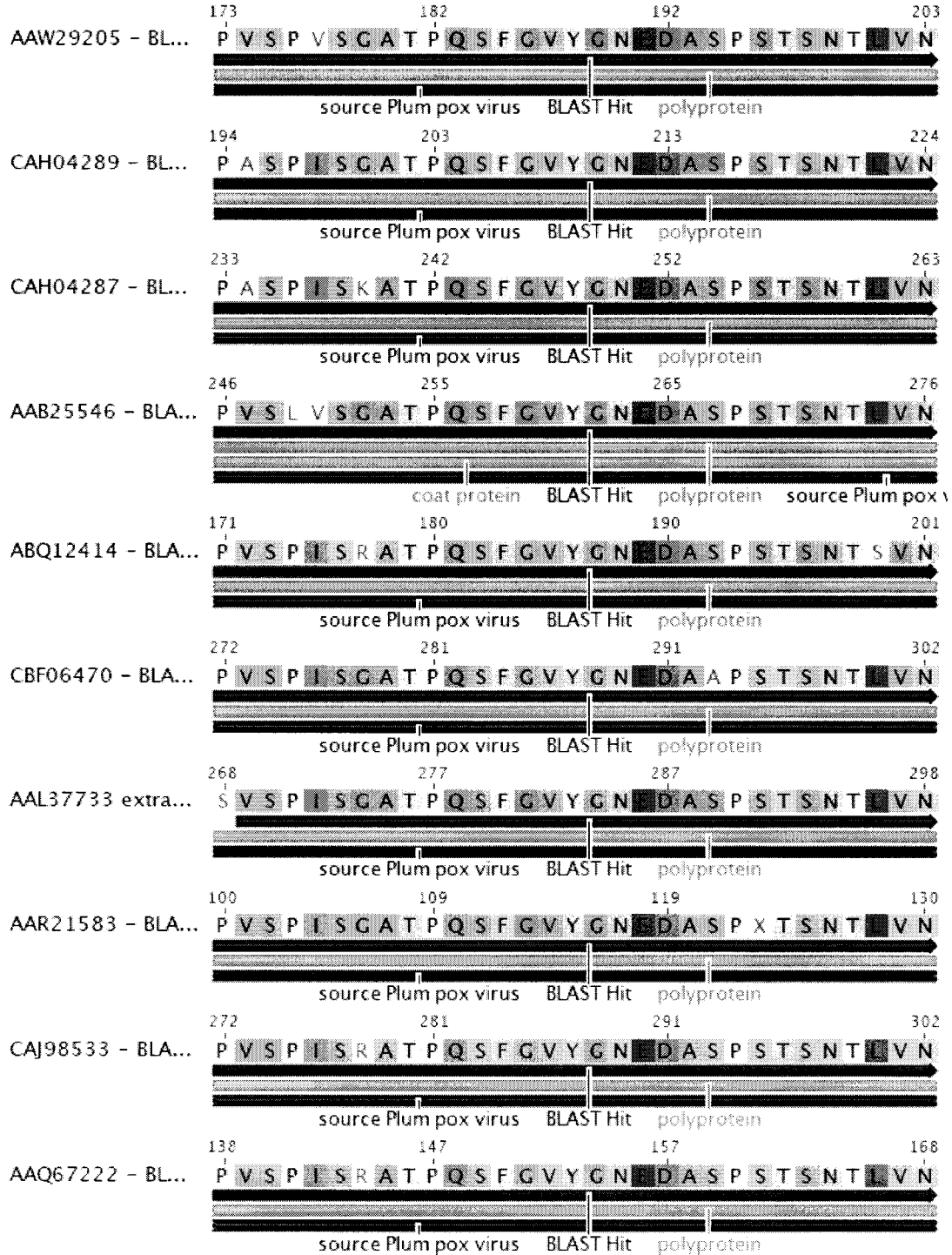
ES 2 374 343 A1



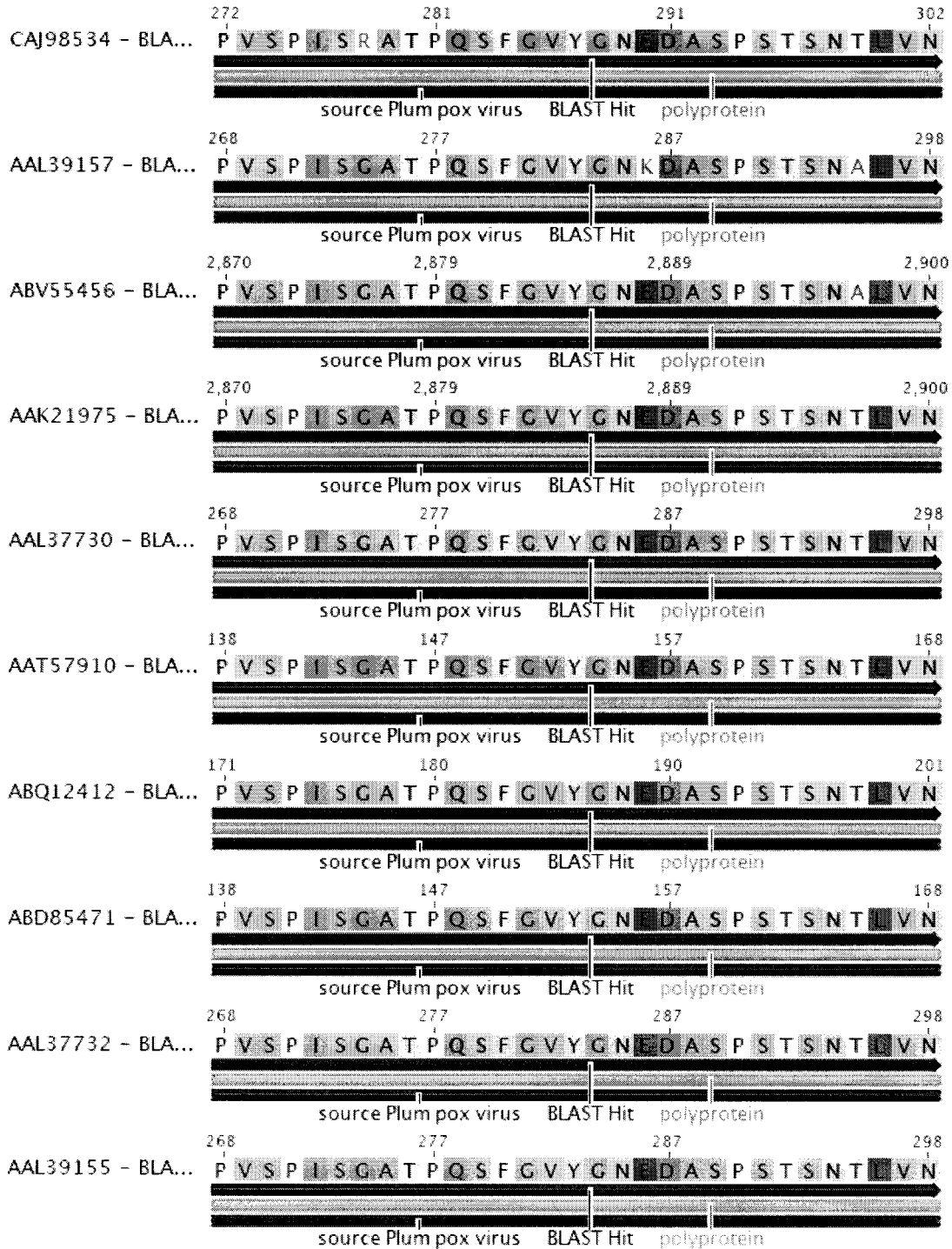
ES 2 374 343 A1



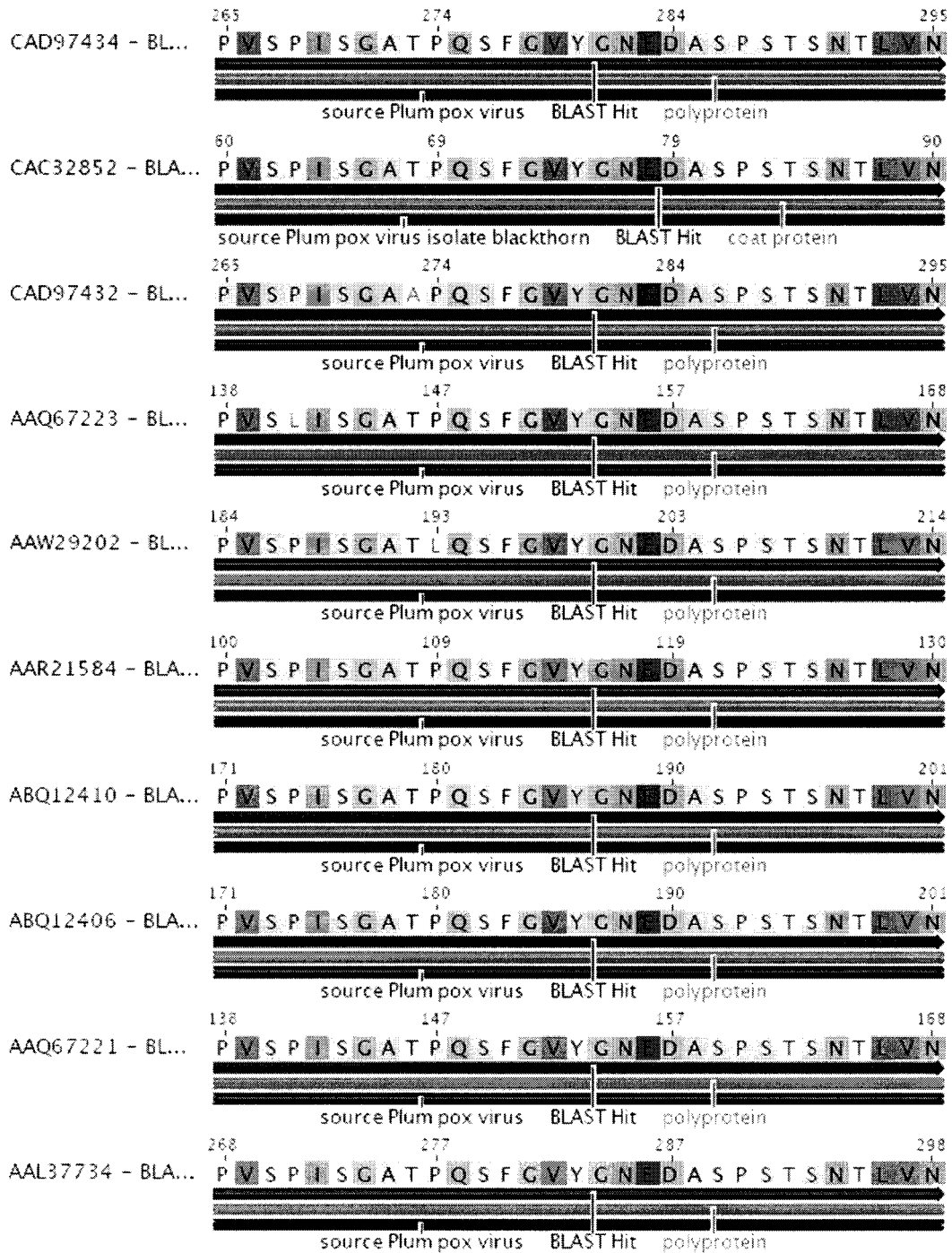
ES 2 374 343 A1



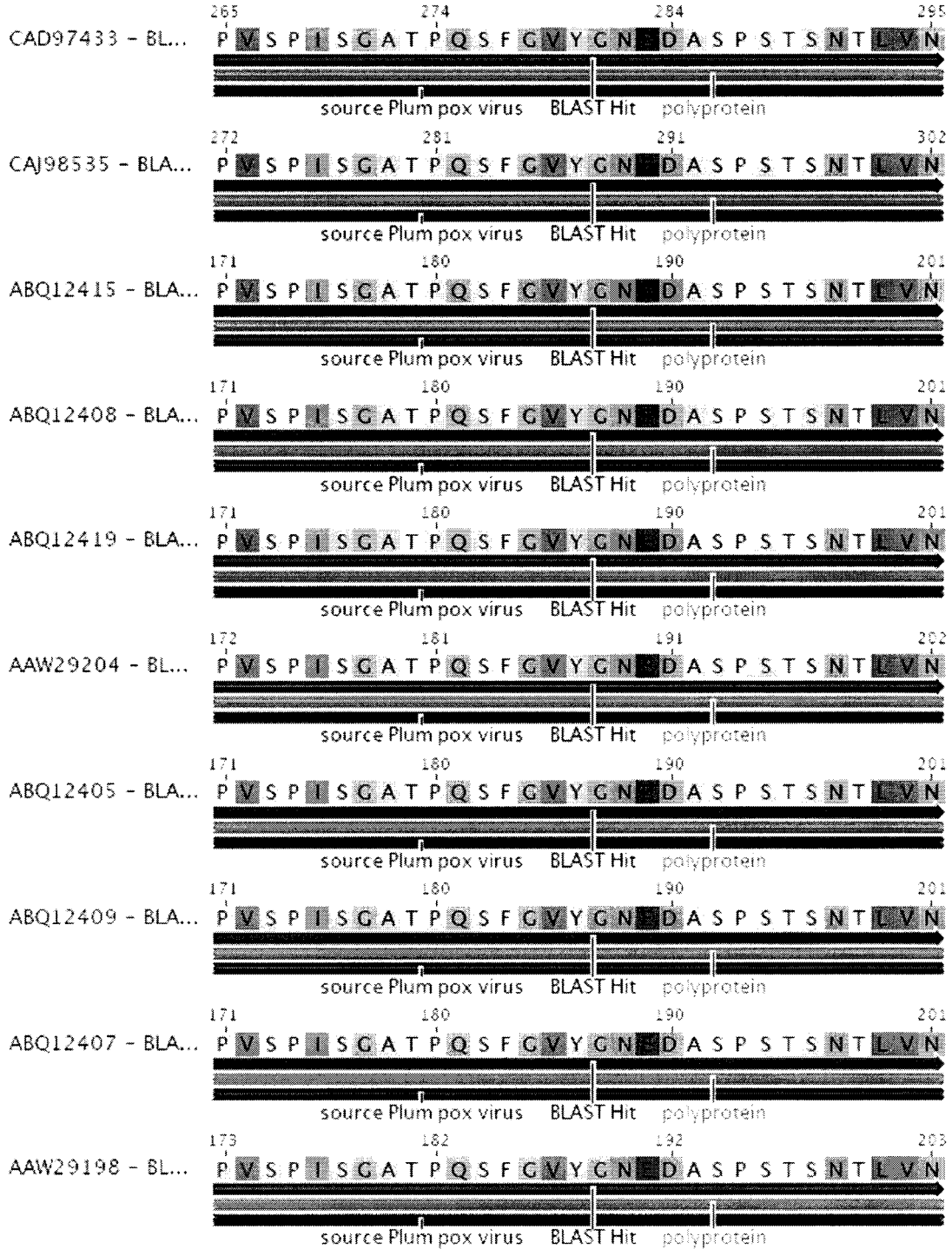
ES 2 374 343 A1



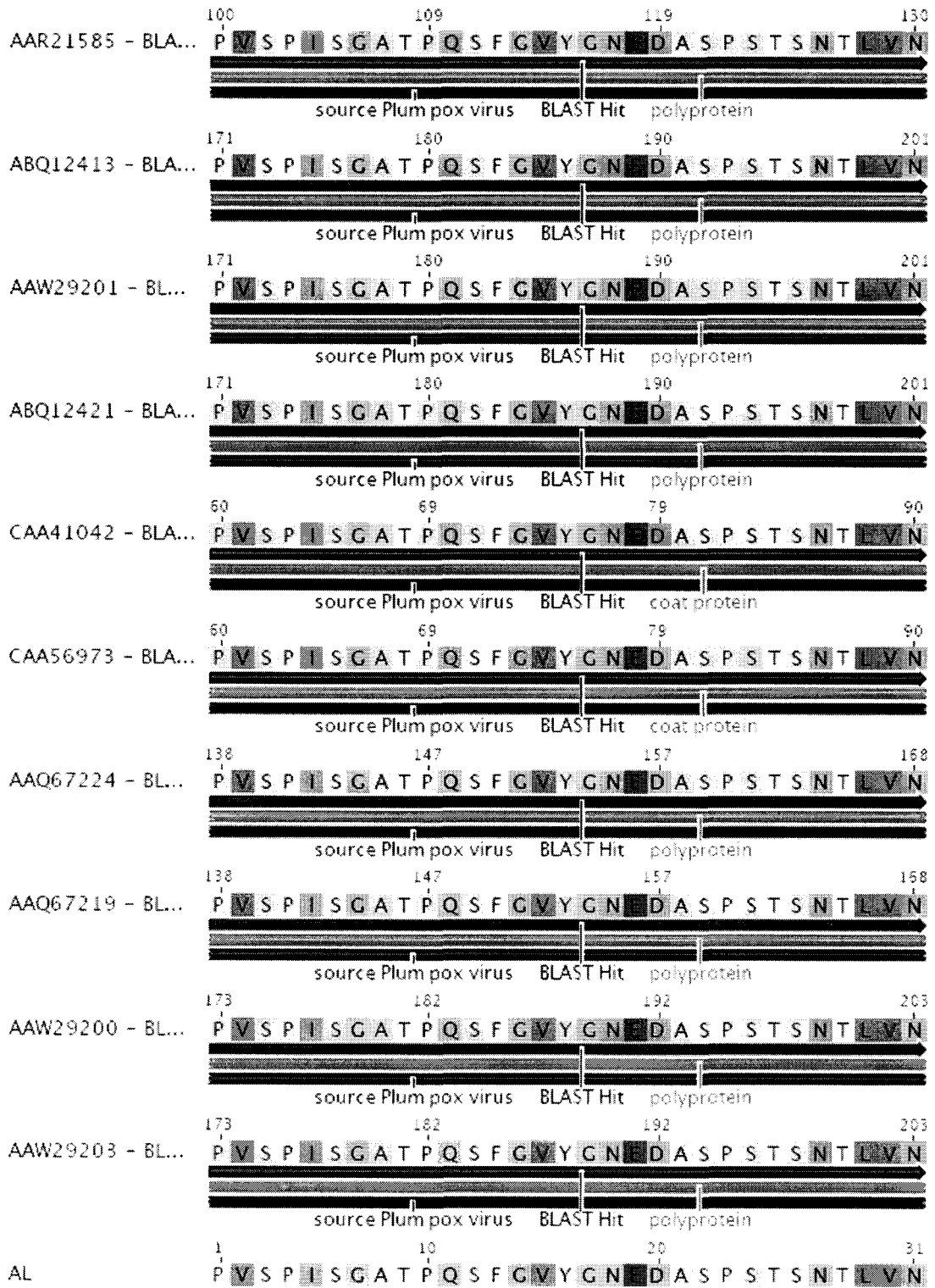
ES 2 374 343 A1



ES 2 374 343 A1



ES 2 374 343 A1



ES 2 374 343 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MANUEL MILLÁN JIMÉNEZ

5 <120> MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE PPV

<130> P-INCI-N-10-003

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> aminoácidos 83-102 de la proteína de la cápsida de PPV

25 <400> 1

30 Ser Asn Ser Asn Ala Leu Val Asn Thr Asn Arg Asp Arg Asp Val Asp
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ile
20

35

<210> 2

<211> 31

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Péptido de la cápside del PPV-M

<400> 2

50 Pro Val Ser Pro Ile Ser Gly Ala Thr Pro Gln Ser Phe Gly Val Tyr
1 5 10 15

55 Gly Asn Glu Asp Ala Ser Pro Ser Thr Ser Asn Thr Leu Val Asn
20 25 30

<210> 3

60 <211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

65 <220>

<223> Upper primer RDRD1

ES 2 374 343 A1

<400> 3

ggccgcaaca aatagagaca gggatgtaga ttaggtcgac gc

42

5

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

10

<213> Artificial

<220>

15

<223> lower primer RDRD2

<400> 4

ggccgcgtcg acctaacta catccctgtc tctatttggt gc

42

20

<210> 5

<211> 25

25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<223> upper primer BamH1

<400> 5

gatccggccc agccggccgt cgacg

25

35

<210> 6

<211> 25

40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

45

<223> Lower primer BamH2

<400> 6

gatccgtcga cggccggctg ggccg

25

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000347

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K14/05** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KOLLEROVA E., et al. <i>Plum pox virus</i> mixed infection detected on apricot in Pakistan. 2006. <i>Plant Disease</i> . Vol. 90 (8), 1108.	1,7-9,16
X	GLASA M., et al. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of <i>Plum pox virus</i> (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. 2004. <i>Journal of General Virology</i> . Vol. 85, 2671-2681, página 2671.	1,7-9,16
X	MATIC S., et al. Diversity of <i>Plum pox virus</i> isolates in Bosnia and Herzegovina. 2006. <i>Plant Pathology</i> . Vol. 55, 11-17, página 12.	1,7-9,16
X	GLASA M., et al. Analysis of recombinant <i>Plum pox virus</i> (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. 2005. <i>Arch. Virol.</i> Vol. 150, 2051-2060, página 2054.	1,7-9,16

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
02.02.2012

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

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

C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-17	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-6, 10-15, 17	SI
	Reivindicaciones 1, 7-9, 16	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	KOLLEROVA E., et al. <i>Plum pox virus</i> mixed infection detected on apricot in Pakistan. <i>Plant Disease</i> . Vol. 90 (8), 1108.	2006
D02	GLASA M., et al. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of <i>Plum pox virus</i> (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. <i>Journal of General Virology</i> . Vol. 85, 2671-2681, página 2671.	2004
D03	MATIC S., et al. Diversity of <i>Plum pox virus</i> isolates in Bosnia and Herzegovina. <i>Plant Pathology</i> . Vol. 55, 11-17, página 12.	2006
D04	GLASA M., et al. Analysis of recombinant <i>Plum pox virus</i> (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. <i>Arch. Virol.</i> Vol. 150, 2051-2060, página 2054.	2005

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 solicitud de patente divulga unos péptidos que comprenden unas determinadas secuencias y el uso de los mismos para la producción de anticuerpos anti-PPV o anti-PPV-M.

Los documentos D01, D02, D03 y D04 reflejan diferentes estudios relacionados con *Plum pox virus* (PPV).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)

En la reivindicación 1 de la solicitud de patente se reivindica un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:1 ó SEQ ID NO:2. En la reivindicación 7 se reivindica un vector, que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica al citado péptido. Las reivindicaciones 8 y 9 reivindican una célula hospedadora y una planta transgénica que comprenden dicho vector. En la reivindicación 16 se reivindica un kit para la detección e identificación de PPV que comprende el péptido reivindicado anteriormente.

El documento D01 divulga (en la página 1108) dos secuencias depositadas en GenBank con los números de acceso: DQ422147 y DQ422148. La traducción de la secuencia DQ422147 comprende a la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:1 en la solicitud de patente y la traducción de la secuencia DQ422148 comprende a la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:2. En el documento D01 también se divulga (en la página 1108) como las secuencias DQ422147 y DQ422148 han sido identificadas en aislados de PPV.

El documento D02 divulga (en la página 2671) dos secuencias identificadas en aislados de PPV con los siguientes números de acceso en GenBank: AY553371 y AY324845. La traducción de la secuencia AY553371 comprende a la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:1 en la solicitud de patente y la traducción de la secuencia AY324845 comprende a la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:2.

El documento D03 divulga (en la página 12) una secuencia de nucleótidos identificada a partir de aislados de PPV con el número de acceso en GenBank: AJ749999. La traducción de esta secuencia comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:1 en la solicitud de patente.

El documento D04 divulga (en la página 2054) una secuencia de nucleótidos con el número de acceso en GenBank: AY690608 que ha sido identificada en aislados de PPV. La traducción de esta secuencia comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:2 en la solicitud de patente.

Teniendo en cuenta la información divulgada en cualquiera de los documentos citados (D01, D02, D03 o D04) la reivindicación número 1 de la solicitud de patente no presenta novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986. La síntesis de un vector que comprenda las secuencias reivindicadas, o de una célula hospedadora que comprenda dicho vector, o de una planta transgénica a la que se le ha introducido el mismo, o la creación de un kit para la detección e identificación de aislados de PPV que comprenda los péptidos codificados por las secuencias reivindicadas no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia, ya que deriva de manera evidente a partir del estado de la técnica. Por tanto, las reivindicaciones 7-9 y 16 presentan novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.