

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 670**

51 Int. Cl.:
C07K 14/59 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06704266 .3**
96 Fecha de presentación: **27.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1844152**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Producción de anticuerpos en plantas con vectores virales de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo**

30 Prioridad:
28.01.2005 EP 05001819
28.01.2005 US 593606 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
ICON GENETICS GMBH
BRIENNERSTRASSE 12A
80333 MÜNCHEN, DE

72 Inventor/es:
GIRITCH, Anatoly;
MARILLONNET, Sylvestre;
KLIMYUK, Victor y
GLEBA, Yuri

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 383 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de anticuerpos en plantas con vectores virales de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de proteínas hetero-oligoméricas en plantas, partes de plantas o cultivos de células vegetales utilizando vectores virales de ARN de cadena sencilla de sentido positivo. El procedimiento y los vectores descritos en la presente invención proporcionan células vegetales con un rendimiento aumentado de proteína recombinante hetero-oligomérica funcional, tal como un anticuerpo de longitud completa o derivados sintéticos hetero-oligoméricos de los mismos que incluyen fusiones con otras proteínas o sus fragmentos.

Antecedentes de la invención

15 La agricultura molecular basada en plantas es una oportunidad atractiva para la producción de proteínas recombinantes destinadas a ser utilizadas en el campo de la salud humana y animal, preferiblemente debido a los potencialmente bajos costes de producción y los intentos de la industria biofarmacéutica de eliminar proteínas obtenidas de animales de los procedimientos de fabricación debido a la posible contaminación de estos productos con patógenos humanos, tales como la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) o enfermedad de Creutzfeld-Jacob (CJD, vCJD). No obstante, la producción de alto rendimiento de proteínas hetero-oligoméricas en células vegetales es un problema que no se puede resolver con la ayuda de sistemas de expresión convencionales basados en el uso de promotores constitutivos fuertes o específicos de tejido por las siguientes razones: en primer lugar, la mayoría de tales proteínas recombinantes tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, perjudicando por lo tanto fuertemente el rendimiento; en segundo lugar, el uso de promotores específicos de tejido (por ejemplo, específicos de semilla) requeriría la incorporación estable de genes que codifican proteínas farmacéuticas en los genomas de plantas de cultivo comestibles (por ejemplo, arroz, maíz, trigo), lo cual puede generar problemas con el control de flujo de transgenes en caso de un cultivo en campo abierto. Además, estos sistemas no son viables comercialmente si se utilizan en ambiente cerrado (invernadero) debido al bajo rendimiento del producto.

30 Los sistemas de expresión transitorios basados en virus vegetales (para una revisión véase: Porta & Lomonosoff, 1996, Mol. Biotechnol., 5, 209-221; Yusibov et al., 1999, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 240, 81-94; Gleba et al., 2004, Curr. Opin. Plant Biol., 7, 182-188) son capaces de proporcionar altos niveles de expresión en tejidos de hojas de plantas y en cierta medida son capaces de abordar los problemas de citotoxicidad de proteínas recombinantes y su efecto perjudicial en el desarrollo de plantas, dado que la tecnología permite separar los estadios de crecimiento y producción. Los sistemas mejor establecidos y viables comercialmente se basan en vectores virales de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, de manera preferible en vectores obtenidos del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) (Kumagai et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 427-430; Mallory et al., 2002, Nature Biotechnol. 20, 622-625; documentos US5316931; US5589367; US5866785; US5977438; WO2088369; WO02097080; WO0229068; US5491076). No obstante, estos sistemas adolecen de limitaciones graves que restringen su uso a la producción de proteínas sencillas relativamente pequeñas. En parte, esto está causado por la inestabilidad de los vectores virales y la alta frecuencia de su reversión al tipo silvestre, si llevan secuencias heterólogas mayor de 1 kb. Además, una limitación grave de la tecnología es la ausencia de sistemas de vector viral capaces de expresar proteínas hetero-oligoméricas complejas como anticuerpos monoclonales terapéuticos y sus derivados que representan el grupo más valioso de proteínas recombinantes.

50 Existe únicamente una publicación que aborda la expresión de un anticuerpo monoclonal de longitud completa en plantas utilizando vectores virales vegetales (Verch et al., 1998, J. Immunol. Meth., 220, 69-75). Esta investigación describe el uso de dos vectores virales basados en TMV sistémicos para la expresión de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo monoclonal en hojas sistémicas, por lo que se expresan las diferentes cadenas a partir de vectores diferentes después de co-infección de plantas de *N. benthamiana* con transcritos sintetizados *in vitro* de dichos vectores. No obstante, el rendimiento de proteína recombinante en dicho sistema es tan bajo que la presencia de anticuerpo monoclonal ensamblado debe confirmarse con pruebas altamente sensibles como transferencia de Western y ELISA. Debido al rendimiento despreciable de anticuerpo recombinante, este sistema no es adecuado para aplicaciones prácticas y no tiene valor comercial. Dado que dos o más vectores virales basados en TMV normalmente no están presentes en los mismos tejidos vegetales de una planta infectada (véase ejemplo 1), la actividad de unión de antígeno detectada puede deberse a anticuerpo que se ha ensamblado *in vitro* durante el procedimiento de aislamiento de las cadenas de anticuerpo pesada y ligera que se expresan en células o en tejido separados. Previamente se ha demostrado que los anticuerpos funcionales se pueden ensamblar *in vitro* a partir de componentes de anticuerpo desnaturalizados y reducidos (Petersen & Dorrington, 1974, J. Biol. Chem., 17, 5633-5641; Maeda et al., 1996, Protein Engineering, 9, 95-100). No obstante, la eficiencia de tal ensamblaje en ausencia de condiciones favorables para tal ensamblaje es muy baja.

65 Por lo tanto, no existe un sistema de expresión a gran escala para proteínas hetero-oligoméricas recombinantes en plantas, cuyo rendimiento y eficiencia pueda ser suficiente para competir en el mercado con otros sistemas de expresión a gran escala como los sistemas de expresión fúngicos o de células de insecto. Tal expresión en planta

puede necesitar satisfacer los siguientes criterios tan bien como sea posible:

- (i) alto rendimiento, incluyendo la expresión de la proteína hetero-oligomérica de interés en tantos tejidos vegetales como sea posible y en muchas células de dichos tejidos;
- (ii) para evitar un efecto perjudicial de la expresión de proteína recombinante en el crecimiento de la planta, la expresión de la proteína o producto de interés debe ser transitoria (o conmutable) de manera que la expresión se pueda iniciar en un estadio deseado del desarrollo de la planta;
- (iii) proporcionar una relación óptima de poliproteínas que codifican diferentes subunidades proteicas hetero-oligomérica en una célula vegetal, respaldando por tanto el alto rendimiento de proteína recombinante a nivel de dicho ensamblaje de proteína recombinante a partir de dichas subunidades.

Por lo tanto, un objetivo de esta invención es proporcionar un procedimiento eficaz para producir una proteína hetero-oligomérica en una planta, una parte de una planta o un cultivo de células vegetales. Un objetivo adicional es el suministro de un sistema de expresión vegetal de alto rendimiento capaz de expresar proteína hetero-oligomérica. Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento eficaz para la co-expresión de más de un polipéptido de interés en la misma célula vegetal. Además, un objetivo de la invención es proporcionar un método rápido y de alto rendimiento para expresar anticuerpos en una planta, parte de una planta o en un cultivo de células vegetales.

Descripción general de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la producción en una planta, un tejido de planta o en células vegetales de una proteína hetero-oligomérica que comprende al menos una primera y una segunda subunidad proteica, comprendiendo dicho procedimiento expresar en células vegetales al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica mediante:

- (i) el suministro a dicha planta, dicho tejido vegetal o a dichas células vegetales de un primer y un segundo vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, codificando dicho primer vector viral al menos dicha primera subunidad proteica, codificando dicho segundo vector viral al menos dicha segunda subunidad proteica, por lo que al menos dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son vectores virales no competitivos como se definen en la reivindicación 1. También se describe un procedimiento que comprende expresar en células vegetales al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica mediante
- (ii) el suministro a dicha planta, dicho tejido vegetal o a dichas células vegetales de un vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, que codifica al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica.

En una realización, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son no competitivos ya que son vectores virales diferentes. En otra realización, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son no competitivos ya que no se obtienen del mismo virus ARN. En otra realización, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son no competitivos ya que difieren en una parte de secuencia diferente de las partes de secuencia que codifican dichas primera y segunda subunidades proteicas. En otra realización, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son no competitivos ya que se obtienen de virus ARN que pertenecen a especies de virus diferentes. En otra realización, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son no competitivos ya que se obtienen de virus ARN que pertenecen a géneros de virus diferentes.

También se describe un procedimiento de producción en una planta, un tejido vegetal o en células vegetales un anticuerpo que comprende al menos una primera y una segunda subunidad proteica como una cadena de anticuerpo pesada y una ligera, comprendiendo dicho procedimiento expresar en células vegetales al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica mediante:

- (i) el suministro a dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales de un precursor de ADN por transfección mediada por *Agrobacterium* de un primer vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, y de un precursor de ADN de un segundo vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, codificando dicho primer vector viral al menos dicha primera subunidad proteica, codificando dicho segundo vector viral al menos dicha segunda subunidad proteica, por lo que al menos dicho primer vector viral o dicho segundo vector viral carecen de un marco de lectura abierto que codifica una proteína funcional necesaria para movimiento sistémico de dicho primer o dicho segundo vector viral en dicha planta; o
- (ii) el suministro a dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales de un precursor de ADN por transfección mediada por *Agrobacterium* de un vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, que codifica al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica, por lo que dicho vector viral carece de un ORF que codifica una proteína funcional necesaria para movimiento sistémico.

Otras realizaciones de la invención se describen en las reivindicaciones y en la descripción siguiente.

Los inventores de la presente invención sorprendentemente han identificado maneras de producir proteínas hetero-oligoméricas con alto rendimiento en plantas utilizando vectores virales vegetales. La producción eficaz de proteínas hetero-oligoméricas en plantas requiere producción de alto rendimiento de las diferentes subunidades proteicas de la

proteína hetero-oligomérica en las mismas células vegetales. De esta manera, la proteína hetero-oligomérica se puede ensamblar eficazmente en células que hayan expresado dichas al menos dos subunidades proteicas utilizando capacidades de ensamblaje de proteína naturales de dichas células como las del retículo endoplásmico (ER). Un ensamblaje *in vitro* ineficaz de dicha proteína hetero-oligomérica por lo tanto no es necesario. La presente invención obtiene por primera vez la co-expresión eficaz de dos o más proteínas en las mismas células por la etapa (i) anterior o por una combinación de las etapas anteriores (i) y (ii).

Dicha primera subunidad proteica está codificada en el vector viral de ARN por una primera secuencia heteróloga (ácido nucleico). Dicha segunda subunidad proteica está codificada en el vector viral por una segunda secuencia heteróloga (ácido nucleico). Estas secuencias heterólogas por lo tanto son secuencias de ARN de dicho o dichos vectores virales y típicamente comprenden o codifican secuencias reguladoras necesarias para expresar dichas subunidades proteicas. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras son promotores subgenómicos, elementos IRES y secuencias 3' no traducidas. En este documento, una secuencia es una secuencia heteróloga si no se encuentra de manera natural en el virus a partir del cual se obtiene u obtienen dicho o dichos vectores virales.

La proteína hetero-oligomérica susceptible de ser producida de acuerdo con la presente invención tiene al menos una primera y una segunda subunidad, por lo que dicha primera y dicha segunda subunidad tienen secuencias polipeptídicas diferentes. Por lo tanto, dicha primera y dicha segunda subunidad típicamente deben expresarse a partir de secuencias diferentes de ácido nucleico heterólogo. Las subunidades de una proteína oligomérica se ensamblan para formar la estructura cuaternaria de la proteína oligomérica. El ensamblaje de las subunidades típicamente implica enlaces no covalentes entre las subunidades. Adicionalmente se pueden formar enlaces covalentes entre dichas subunidades proteicas, por ejemplo, enlaces disulfuro.

En una realización, dicha proteína hetero-oligomérica es una proteína hetero-dimérica, es decir, una proteína que tiene dos subunidades proteicas diferentes. En otra realización, dicha proteína hetero-oligomérica puede tener más de dos subunidades diferentes, por ejemplo, 3 o 4 subunidades diferentes (proteína hetero-trimérica o hetero-tetramérica, respectivamente). En una realización adicional, dicha proteína hetero-oligomérica puede tener dos subunidades diferentes, por lo que una o ambas de dichas subunidades pueden estar presentes en dicha proteína hetero-oligomérica más de una vez. Los ejemplos de la organización de subunidades de dicha proteína hetero-oligomérica son $A_n B_m$, $A_n B_m C_k$ y $A_n B_m C_k D_l$, en donde A indica una primera subunidad proteica, B indica una segunda subunidad proteica y C y D indican subunidades proteicas adicionales. Cada letra mayúscula A, B, C y D indica subunidades proteicas diferentes de las otras subunidades proteicas y las letras minúsculas indican números enteros de al menos 1 que indican el número de copias de la subunidad proteica respectiva en dicha proteína hetero-oligomérica. Un ejemplo son los anticuerpos IgG, que tienen la organización de subunidades $A_2 B_2$, en donde A representa una primera subunidad proteica (por ejemplo, la cadena pesada) y B representa una segunda subunidad proteica (por ejemplo, la cadena ligera). Preferiblemente, la proteína hetero-oligomérica producida de acuerdo con la invención tiene dos o tres subunidades proteicas diferentes, de manera más preferible tiene dos subunidades proteicas diferentes.

En el procedimiento de la invención, al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica se expresan en células de dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales por dicha etapa (i). Cada una de dichas etapas (i) y (ii) permite la expresión de al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica en las mismas células de manera que dicha proteína hetero-oligomérica puede producirse eficazmente en dichas células. Las etapas (i) y (ii) se pueden realizar en paralelo, principalmente para la producción de proteínas hetero-oligoméricas que tengan tres, cuatro o más subunidades proteicas diferentes (véase el ejemplo 7).

Dicho o dichos vectores virales de ARN de cadena sencilla de sentido positivo de la invención también se denominan en este documento simplemente "vector viral". Típicamente, dichos vectores virales de ARN de cadena sencilla de sentido positivo se obtienen de virus ARN de plantas de cadena sencilla de sentido positivo.

En la etapa (ii), dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales están provistos de un vector viral de ARN de cadena sencilla, de sentido positivo, que codifica al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica. Dicho vector viral que codifica al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica contiene, como un inserto, una primera secuencia heteróloga que codifica dicha primera subunidad proteica, cuya expresión puede estar bajo el control de un primer promotor subgenómico. Además, dicho vector viral contiene, como un inserto, una segunda secuencia heteróloga que codifica dicha segunda subunidad proteica, cuya expresión puede estar bajo el control de un segundo promotor subgenómico. Si tanto dicha primera como dicha segunda subunidad proteica se expresan bajo el control de un promotor subgenómico, estos promotores subgenómicos preferiblemente difieren en secuencia para evitar autohomología en dicho vector viral, lo cual puede generar a eventos de recombinación no deseados en células vegetales. Tales promotores subgenómicos diferentes pueden extraerse de cepas o especies diferentes de un virus vegetal, por ejemplo, un promotor subgenómico puede ser (o se puede obtener de) el promotor subgenómico de la proteína de envuelta (CP) del virus del mosaico del tabaco (TMV) U1 y el otro promotor subgenómico puede ser (o se puede obtener de) el promotor subgenómico de CP de TMV U5 o del tobamovirus que infecta crucíferas (cr-TMV).

En vez de dicho primer o dicho segundo promotor subgenómico, la traducción de dicha primera o dicha segunda

subunidad proteica puede estar bajo el control de un elemento IRES (sitios de entrada al ribosoma interno). Aunque la traducción tanto de dicha primera como de dicha segunda subunidad proteica puede estar bajo el control de elementos IRES, se prefiere que al menos una de dichas subunidades proteicas se exprese utilizando un promotor subgenómico. Los elementos IRES para el uso en la presente invención pueden tomarse de virus de plantas como cr-TMV u otros virus de plantas (Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99, 5301-6; Virology 1999, 263, 139-54; documentos WO03020927; WO0229068).

Dicho vector viral de la etapa (ii) preferiblemente no tiene capacidad de movimiento sistémico en dicha planta o dicho tejido vegetal. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, al suprimir un origen funcional del ensamblaje de partícula viral. Por ejemplo, en tobamovirus, el origen de ensamblaje de partícula viral se localiza en el ORF de MP. Por lo tanto, el origen de ensamblaje de partícula viral se puede omitir delecionando total o parcialmente el ORF de MP de dicho vector viral. Dicho vector viral por lo tanto preferiblemente carece del ORF de una proteína de movimiento funcional (MP). De manera más preferible, dicho vector viral carece de una proteína funcional necesaria para el movimiento sistémico de dicho vector viral. En esta realización, dicho vector viral puede carecer de un ORF de la proteína de envuelta funcional, y de manera más preferible, dicho vector viral carece tanto del ORF de la proteína de movimiento funcional como del ORF de la proteína de envuelta funcional. Al suprimir el ORF de MP y/o el ORF de CP del vector viral se proporciona más espacio para la codificación al menos de dicha primera y dicha segunda subunidad proteica en dicho vector viral sin comprometer la estabilidad del vector viral. En esta realización, dicho vector viral preferiblemente se proporciona a muchas células de dicha planta o dicho tejido vegetal para obtener la infección de muchas células. Esto se puede llevar a cabo de la mejor manera proporcionando un precursor de ADN de dicho vector viral de ARN como ADN-T utilizando *Agrobacterium* (véase abajo).

El virus del cual se obtiene dicho vector viral para la etapa (ii) puede ser cualquier virus ARN de planta de cadena sencilla de sentido positivo, por ejemplo, los incluidos en el capítulo "Descripción Detallada". Los grupos preferidos de virus son tobamovirus, potexvirus y potyvirus. Los virus más preferidos son TMV y PVX. Dicho vector viral contendrá al menos los ORF del virus del cual se obtienen que codifiquen proteínas necesarias para la replicación de dicho vector viral. Dicho vector viral típicamente contiene además elementos reguladores para la replicación viral y al menos un promotor subgenómico.

En la etapa (i), dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales están provistos de un primer y segundo vector viral de ARN de cadena sencilla de sentido positivo. Dicho primer vector viral codifica al menos dicha primera subunidad proteica, dicho segundo vector viral codifica al menos dicha segunda subunidad proteica.

La etapa (i) permite producir proteínas hetero-oligoméricas que tienen dos subunidades proteicas diferentes. La etapa (i) también permite producir proteínas hetero-oligoméricas que tienen más de dos subunidades diferentes, por ejemplo, tres o cuatro subunidades proteicas diferentes. En este caso, dicha planta, tejido vegetal o células vegetales se pueden proporcionar con un primer, un segundo y un tercer vector viral (y opcionalmente con un vector viral adicional), codificando cada uno una de dichas diferentes subunidades proteicas. Si se van a expresar tres o cuatro subunidades proteicas diferentes en la etapa (i), los tres o cuatro vectores virales respectivos preferiblemente son todos vectores virales no competitivos entre sí. En el caso de tres vectores virales, el primer vector viral se puede obtener de un tobamovirus, el segundo vector viral se puede obtener de un potyvirus y el tercer vector viral se puede obtener de un potexvirus.

Dos vectores virales son no competitivos si pueden expresar eficazmente las subunidades proteicas que codifican en la misma célula vegetal (co-expresión). La co-expresión requiere que al menos dos vectores virales diferentes no compitan entre sí durante la replicación antes de haber expresado cantidades sustanciales de las secuencias heterólogas que codifican. Cuanto mayores sean las diferencias de secuencia a nivel de ARN de dichos al menos dos vectores virales, mayor será la no competitividad en las mismas células vegetales. Dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son vectores virales no competitivos, dado que dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son vectores virales diferentes.

Para que sean no competitivos, dicho primer y dicho segundo vector viral (dichos dos vectores virales no competitivos) difieren, en una realización general, al menos en una parte de secuencia diferente de dichas secuencias heterólogas que codifican dichas subunidades proteicas. Preferiblemente, tal diferencia en una parte de secuencia diferente de dichas secuencias heterólogas es una parte de secuencia obtenida de un virus ARN de planta tal como una parte de secuencia implicada en una función viral, tal como la replicación viral en células vegetales (por ejemplo, una secuencia que codifica una replicasa), traducción de una proteína viral (por ejemplo, un promotor subgenómico) o movimiento viral de célula a célula o a distancia larga.

Para que sean no competitivos, dicho primer y dicho segundo vector viral (dichos dos vectores virales no competitivos) se obtienen, en otra realización general, de virus de planta diferentes. En un ejemplo de esta realización, dichos al menos dos vectores virales no competitivos no se obtienen de virus de la misma cepa de virus. En otro ejemplo, dichos al menos dos vectores virales no competitivos no se obtienen de virus de la misma especie de virus. En un ejemplo adicional, dichos al menos dos vectores virales no competitivos no se obtienen de virus del mismo género de virus. Por lo tanto, dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral preferiblemente se obtienen de virus de cepas diferentes, de manera más preferible de virus de especies diferentes y de manera mucho

más preferible de virus de géneros diferentes.

Dicho primer vector viral se puede obtener de un virus que pertenece al género Potexvirus y dicho segundo vector viral se puede obtener de un virus que pertenece al género Potyvirus. Específicamente, dicho primer vector viral se puede obtener del virus X de patata y dicho segundo vector viral se puede obtener del virus Y de patata.

En el caso de un vector potyviral, dicha subunidad proteica se puede expresar como una fusión con una poliproteína viral, por lo que una subunidad proteica de la invención se puede separar de dicha poliproteína por un sitio de reconocimiento de proteasa potyviral.

En otra realización, dicho primer vector viral se puede obtener de un virus que pertenece al género Potexvirus y dicho segundo vector viral se puede obtener de un virus que pertenece al género Tobamovirus. Específicamente, dicho primer vector viral se puede obtener del virus X de patata y dicho segundo vector viral se puede obtener del Virus del Mosaico del Tabaco.

La expresión "obtenido de un virus" significa que el vector viral contiene elementos genéticos o partes de secuencia del virus del cual se obtiene. En una realización, dicho o dichos vectores virales contienen un ORF (marco de lectura abierto) de replicasa tomado de un virus ARN. En otra realización, un vector viral contiene un ORF de proteína de movimiento de un virus ARN y opcionalmente también un ORF de replicasa. Los elementos genéticos virales tomados de un virus ARN, si se desea, se pueden mutar, por ejemplo, para introducir los sitios de restricción necesarios para clonación del vector viral.

Una realización en donde dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral están ambos basados en el vector viral del mosaico del tabaco TMV 30 B se excluye de la etapa (i) del procedimiento de la invención, dado que en este caso dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral no son vectores virales diferentes sino que son los mismos vectores virales (compárese con Verch et al., J. Immunological Methods 220 (1998) 69-75).

Dicho primer y dicho segundo vector viral (dichos vectores virales no competitivos) preferiblemente tienen una homología de secuencia a nivel de ARN de como máximo el 90%, de manera más preferible como máximo el 80%, incluso de manera más preferible como máximo el 70% y de manera mucho más preferible como máximo el 60%. De manera más específica, cualquier segmento de secuencia de dicho primer vector viral de 100 bases preferiblemente tiene una homología de secuencia con cualquier segmento de secuencia de 100 bases de dicho segundo vector viral de como máximo el 90%, de manera preferible como máximo el 80%, de manera más preferible como máximo el 70% y de manera mucho más preferible como máximo el 60%.

En una realización, el ORF de replicasa (o los ORF si la replicasa está codificada por más de un ORF) de dicho primer vector viral y el ORF de replicasa (o los ORF si la replicasa está codificada por más de un ORF) de dicho segundo vector viral tienen una homología como máximo del 90%, de manera más preferible como máximo del 80%, incluso de manera más preferible como máximo del 70% y de manera mucho más preferible como máximo del 60%. En otra realización, el ORF de replicasa de dicho primer vector viral y el ORF de replicasa de dicho segundo vector viral tienen una identidad como máximo del 85%, de manera más preferible como máximo del 75%, incluso de manera más preferible como máximo del 65% y de manera mucho más preferible como máximo del 55%.

En la etapa (i), dicho primer vector viral preferiblemente contiene una primera secuencia heteróloga que codifica dicha primera subunidad proteica, cuya expresión puede estar bajo el control de un primer promotor subgenómico. Dicho segundo vector viral contiene una segunda secuencia heteróloga que codifica dicha segunda subunidad proteica, cuya expresión puede estar bajo el control de un segundo promotor subgenómico. Uno o ambos de dichos promotores subgenómicos pueden estar sustituidos con un elemento IRES. Similar a lo descrito anteriormente para la etapa (ii), si tanto dicha primera como dicha segunda subunidad proteica se expresan bajo el control de un promotor subgenómico, estos promotores subgenómicos preferiblemente difieren en secuencia para evitar homología entre dicho primer y dicho segundo vector viral (y cualquier vector viral adicional), lo cual puede llevar a acontecimientos de recombinación no deseados en células vegetales. Tales promotores subgenómicos diferentes pueden provenir de cepas o especies diferentes de virus de plantas, por ejemplo, un promotor subgenómico puede ser el promotor subgenómico de la proteína de envuelta (CP) del virus del mosaico del tabaco (TMV) U1 y el otro promotor subgenómico puede ser el promotor subgenómico de CP de TMV U5 o de tobamovirus que infecta crucíferas (cr-TMV).

Dado que los ORF de virus de plantas que se requieren para el movimiento célula a célula o de distancias largas se puede omitir tras construir los vectores virales de la invención, la relación de dichos vectores virales no competitivos se puede determinar comparando los ORF de replicasa de dichos vectores virales.

Dicha primera y dicha segunda secuencia heteróloga que codifican dicha primera y dicha segunda subunidad proteica, respectivamente, se pueden añadir como una secuencia adicional a dichos vectores virales. Dichas secuencias heterólogas preferiblemente se añaden de manera que se obtiene un alto nivel de expresión. Para este fin, dicha secuencia heteróloga se añade en el extremo 3' del virus, dado que el ORF 3' con frecuencia es el ORF que se expresa con mayor cantidad en muchos virus. No obstante, de manera preferible, dichas secuencias

heterólogas sustituyen una secuencia nativa para dicho virus, por ejemplo, el ORF 3' natural del virus, que es el ORF de CP en muchos virus como tobamovirus. Por lo tanto, dicho primer y/o dicho segundo vector viral preferiblemente carecen de un ORF para el movimiento sistémico de dicho vector viral. Dichos vectores virales pueden carecer además de un ORF para movimiento célula a célula como el ORF de MP en tobamovirus.

5 En esta invención se pueden combinar la etapa (i) y la etapa (ii), de manera notable para expresar tres o más subunidades diferentes de una proteína hetero-oligomérica. Si se va a producir una proteína hetero-oligomérica que tenga cuatro subunidades proteicas diferentes, se pueden expresar dos subunidades proteicas de acuerdo con la etapa (i) y se pueden producir dos subunidades proteicas adicionales en las células de una planta o un tejido vegetal
10 de acuerdo con la etapa (ii). No obstante, de manera preferible se pueden expresar dos subunidades proteicas de un primer vector viral y se pueden expresar dos subunidades proteicas de un segundo vector viral que sea no competitivo con el primer vector viral. Si se va a producir una proteína hetero-oligomérica que tenga tres subunidades proteicas diferentes, dichas tres subunidades proteicas se pueden expresar de acuerdo con la etapa (i) al expresar dos proteínas de un primer vector viral de forma similar a lo descrito para la etapa (ii) y expresar una
15 tercera subunidad proteica de un vector viral no competitivo.

Los vectores virales de la invención típicamente se modifican por ingeniería genética a nivel de ADN. Si dichos vectores virales se proporcionan a células de una planta o a células de tejido vegetal como vectores virales de ARN, dicho ADN se puede transcribir *in vitro* a dichos vectores virales de ARN, por ejemplo, utilizando una polimerasa de bacteriófago como la polimerasa de T7 junto con un promotor adecuado. Preferiblemente se aplican a dicha planta dos vectores virales diferentes como una mezcla para asegurar que las células de dicha planta estén provistas de ambos vectores virales. No obstante, de manera preferible, los vectores virales de la invención se proporcionan a células de una planta o a células de un tejido vegetal transformando dicha planta o dicho tejido vegetal con
20 precursores de ADN de dichos vectores virales de ARN. Dichos precursores de ADN pueden tener un promotor transcripcional activo en células de dicha planta para formar dichos vectores virales por transcripción de dichos precursores de ADN. De manera mucho más preferible, dichos precursores de ADN son ADN-T en los plásmidos Ti agrobacterianos. Después se pueden proporcionar dos o más vectores virales a dicha planta o dicho tejido vegetal por tratamiento de dicha planta con una mezcla (por ejemplo, una suspensión) de dos o más cepas de *Agrobacterium*, por lo que cada cepa contiene un ADN-T que codifica un vector viral particular. El tratar partes
25 sustanciales de una planta con tal suspensión de *Agrobacterium* puede sustituir la función de movimiento sistémico y/o la función de movimiento de célula a célula de virus de planta naturales.

La transfección transitoria de dicha planta, tejido vegetal o células vegetales con precursores de ADN de dichos vectores virales por medio de *Agrobacterium* es la forma más preferida en la presente invención. No obstante, dichos precursores de ADN de dichos vectores virales se pueden incorporar de manera estable en el ADN cromosómico de la planta. La liberación de dicho o dichos vectores virales del ADN cromosómico se puede controlar por promotores inducibles.

Si dichos vectores virales se proporcionan a dicha planta por medio de precursores de ADN, se prefiere que se tomen medidas para mejorar la eficiencia de transferencia de dichos vectores virales desde los núcleos de las células en donde se transcriben al citoplasma donde dichos vectores virales se replican. Esto se puede obtener incluyendo intrones en dichos precursores de ADN, específicamente en los ORF de replicasa de los vectores virales como se describe con detalle en la solicitud internacional de patente PCT/EP05/000492, publicada como documento
40 WO2005/71090.

El procedimiento de la invención se puede aplicar a cualquier planta para la cual existan sistemas de expresión virales de planta o que sean elaborados en el futuro. Dicha planta puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. Entre las dicotiledóneas se prefieren las *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae* y las leguminosas. Entre las *Solanaceae*, el género *Nicotiana* como *N. tabacum* o *N. benthamiana* son las que se prefieren. Otras plantas preferidas son *Medicago sativa* y las especies de *Beta* como *Beta vulgaris*.

El procedimiento de la invención se utiliza para producir proteínas hetero-oligoméricas en sistemas vegetales. Las proteínas hetero-oligoméricas preferidas son inmunoglobulinas como las inmunoglobulinas de las siguientes clases: inmunoglobulina G, inmunoglobulina A, inmunoglobulina M, inmunoglobulina D e inmunoglobulina E. Estas
55 inmunoglobulinas pueden comprender al menos una parte de un dominio de unión a antígeno. Según lo requiera el caso, estas inmunoglobulinas producidas de acuerdo con la invención se pueden modificar en relación a las inmunoglobulinas animales nativas con la condición de que comprendan al menos dos subunidades proteicas diferentes. La inmunoglobulina puede comprender una proteína de protección en asociación con una cadena pesada de inmunoglobulina, en la que la proteína de protección comprende una parte de un receptor de poliiinmunoglobulina. Otra proteína hetero-oligomérica preferida es insulina.

La proteína hetero-oligomérica de la invención se puede modificar de muchas maneras diferentes en relación a la proteína nativa según lo requiera el caso. En la proteína hetero-oligomérica, una secuencia líder nativa que forma una señal de secreción de una o más subunidades proteicas de la proteína hetero-oligomérica nativa se puede
65 sustituir por péptidos señal específicos de planta. Dichos péptidos señal específicos de planta se pueden obtener de calreticulina de tabaco y/o alfa-amilasa de arroz. Al menos una o al menos dos o más subunidades de dicha proteína

hetero-oligomérica pueden contener una señal de retención en retículo endoplásmico KDEL para mejorar el ensamblaje de dicha proteína hetero-oligomérica a partir de dichas subunidades en células vegetales. Además, dichas secuencias heterólogas que codifican dichas subunidades proteicas se pueden mutar con el fin de retirar parcial o completamente los sitios de glucosilación de dicha proteína hetero-oligomérica. Además, el patrón de glucosilación de la proteína hetero-oligomérica que se va a expresar se puede cambiar, por ejemplo, modificando por ingeniería genética un componente de la maquinaria de glucosilación de la planta como una o más glucosil transferasas.

La proteína hetero-oligomérica de la invención se puede aislar de la planta, del tejido vegetal o células vegetales después de la expresión de acuerdo con procedimientos conocidos de manera general. Dicha proteína hetero-oligomérica después se puede purificar hasta homogeneidad sustancial, estado que se puede definir de manera que las bandas debidas a dicha proteína hetero-oligomérica en un SDS-PAGE teñido con coomassie constituyen al menos el 70%, de manera preferible al menos el 80% y de manera más preferible al menos el 90% de la tinción de un carril, determinado por un lector de gel convencional.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 (A) muestra un patrón de distribución de expresión de GFP y DsRed de dos vectores basados en TMV diferentes en hojas infiltradas de *N. benthamiana*. Imagen izquierda: el punto de luz en el lado superior izquierdo es fluorescencia de GFP de un área infiltrada con pICH17272. El punto de luz débil debajo es fluorescencia roja de un área infiltrada con el vector pICH18505. El punto de luz en el lado derecho inferior de la imagen izquierda es un área infiltrada con pICH17272 + pICH18505. Las imágenes del lado derecho muestran protoplastos aislados de un área de hoja co-infiltrada con dos vectores diferentes (parte superior: protoplastos en condiciones de detección de fluorescencia de GFP; panel inferior: los mismos protoplastos en condiciones de detección de fluorescencia de DsRed. (B) es una representación esquemática de regiones de ADN-T de pICH17272 y pICH18505. P - promotor de transcripción; T - región de terminación de transcripción; RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN viral; MP - proteína de movimiento viral; 3'NTR - región no traducida 3' viral; Cr-sgp - región de promotor subgenómico de CP de la cepa crTMV; GOI - gen de interés. (C) son representaciones esquemáticas de mapas de restricción de las regiones de ADN-T de pICH17272 y pICH18505.

La figura 2 muestra una representación esquemática de una región de ADN-T de un vector viral diseñado para co-expresión de dos transgenes diferentes (GOI-1 y GOI-2) a partir de promotores subgenómicos diferentes. P - promotor de transcripción; T - región de terminación de transcripción; RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN viral; MP - proteína de movimiento viral; 3'NTR - región no traducida 3' viral; Cr-sgp - región de promotor subgenómico de CP de la cepa crTMV; 3PK - región de pseudonudo triple; U5sgp - promotor subgenómico de CP de la cepa TMV-U5. GOI - gen de interés.

La figura 3(A) muestra representaciones esquemáticas de regiones de ADN-T de construcciones pICH17388, pICH17123, pICH15933, pICH7410, pICH10580, pICH10881 y pICH10745. RS - sitio de recombinación reconocido por PhiC31 integrasa. Las barras verticales grises indican intrones. (B) muestra mapas de restricción de las regiones de ADN-T de pICH17388, pICH17123, pICH15933. (C) muestra mapas de restricción de las regiones de ADN-T de pICH7410, pICH10580, pICH10881 y pICH10745.

La figura 4 muestra en (A) microfotografías de microscopio de fluorescencia de una región de hoja de *N. benthamiana* 6 días después del suministro agrobacteriano de precursores de ADN pICH17388 y pICH15933 junto con una fuente de recombinasa. RS - sitio de recombinación reconocido por PhiC31 integrasa.

La figura 5 muestra representaciones esquemáticas de regiones de ADN-T de sistemas de vector diferentes para la expresión de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo. RS - sitio de recombinación reconocido por PhiC31 integrasa.

La figura 6 muestra una transferencia de Western de la expresión de una IgG en hojas de *Nicotiana benthamiana* utilizando el sistema de provector viral.

La separación electroforética de TSP se llevó a cabo en un gel al 12% en condiciones no reductoras. La detección de la proteína expresada se realizó con la fracción anti-IgG humana de conejo conjugada con HRP (Sigma) diluida 6×10^3 .

Carril: 1 - tejido de hoja no infectada; carril 2 - cadena pesada de IgG expresada en citosol (pICH17388); carril 3 - cadenas pesada y ligera de IgG, co-expresión con las construcciones de promotor 35S (pIC0123+pICH19846); carril 4 - igual que el carril 3 con P19 (pICH6692); carril 5 - GFP expresada con las construcciones de promotor 35S y P19 (pICH5290+pICH6692); carril 6 - co-expresión de las cadenas pesada y ligera de IgG con la construcción bicistrónica pICH19860; carril 7 - co-expresión de las cadenas pesada y ligera de IgG con la construcción bicistrónica pICH19860 (pro-vector 5' deficiente en MP pICH17123, MP *in trans* pICH10745); carril 8 - GFP y dsRED co-expresados en citosol, MP proporcionada *in trans* (pICH17123 + pICH19919 + pICH10745).

La figura 7 muestra una representación esquemática de regiones de ADN-T que codifican vectores virales no competitivos diseñados para co-expresión de subunidades proteicas diferentes de interés en la misma célula vegetal. P - promotor de transcripción; T - región de terminación de transcripción; TMV RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN viral del Virus del Mosaico del Tabaco; PVX RdRP ARN polimerasa dependiente de ARN viral del Virus de Patata X; MP - proteína de movimiento viral; 3'NTR - región no traducida 3' viral; Cr-sgp - región de promotor subgenómico de CP de la cepa crTMV; GOI - gen de interés que codifica una subunidad proteica de interés.

La figura 8 muestra una representación esquemática de la región de ADN-T del vector binario pIC0130.

La figura 9 muestra la co-expresión de GFP y dsRED en células vegetales utilizando vectores basados en TMV (pICH17388 + pICH10580) y PVX (pIC0130): visualización de GFP y dsRED en protoplasto aislado de hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas.

La figura 10 (A) muestra la representación esquemática de regiones de ADN-T de vectores binarios pICH17620, pICH20431, pICH21240, pICH20421 y pICH21370.

(B) es una representación esquemática de las regiones de ADN-T de vectores binarios pICH11599, pICH21910 y pICH21920.

(C) es una representación esquemática de las regiones de ADN-T de vectores binarios pICH21282, pICH10990, pICH22250 y pICH22240. Lv y Lc - regiones variables y conservadas de la cadena ligera; Hv y Hc - regiones variables y conservadas de la cadena pesada.

(D) es una representación esquemática del esquema de clonación del provector derivado de PVX pICH21380.

La figura 11(A) muestra los resultados de una prueba de ELISA para la determinación de los niveles de co-expresión de las cadenas ligera y pesada de IgG utilizando los vectores PVX y crTMV. La numeración de los pocillos de la placa de cultivo tisular a la izquierda corresponde con la numeración de las barras en el histograma. El histograma presenta la DO de los pocillos a 405 nm.

1, 2- tejido vegetal no infectado;

3, 4, 5- calreticulina SP - Cadena Pesada en PVX (clones pICH21240-1, 5 y 14, respectivamente);

6, 7, 8- calreticulina SP - Cadena Ligera (LC) de IgG en PVX (deleción en el extremo N, pICH21370-18, 19, 31, respectivamente);

9, 10, 11- calreticulina SP - Cadena Ligera de IgG en PVX (pICH21370-40, 44, 45, respectivamente); 12- control en blanco (no se aplica extracto de proteína vegetal);

13, 14, 15- calreticulina SP - Cadena Pesada (HC) de IgG en PVX (clones pICH21240-1, 5 y 14, respectivamente) co-expresado con calreticulina SP - Cadena Ligera de IgG en crTMV (pICH 17620+pICH10881+pICH20431);

16, 17, 18- calreticulina-LC de IgG en PVX (deleción en el extremo N, pICH21370-18, 19, 31, respectivamente) co-expresado con calreticulina-HC en crTMV (pICH 17620+pICH10881+pICH20421);

19, 20, 21 - calreticulina SP-LC de IgG en PVX (pICH21370-40, 44, 45, respectivamente) co-expresado con calreticulina SP- Cadena Pesada en vector basado en crTMV (pICH 17620+pICH10881+pICH20421);

22 - GFP expresada con PVX (pIC0130);

23 - GFP expresada con PVX (pICH20799);

24 - calreticulina SP- Cadena Ligera de IgG expresada a partir de crTMV sólo (pICH 17620+pICH10881+pICH20431);

25 - calreticulina SP - Cadena Pesada de IgG expresada a partir de vector basado en crTMV (pICH 17620+pICH10881+pICH20421);

26 - Cadenas Ligera y Pesada de IgG co-expresadas bajo el control del promotor 35S fuerte en presencia del supresor de PTGS P19;

27 - co-expresión de las Cadenas Ligera y Pesada de IgG a partir del vector basado en crTMV (pICH17388+pICH10881=pICH20241);

28 - co-expresión de las Cadenas Ligera y Pesada a partir del vector basado en crTMV (pICH17388+pICH10881=pICH20241), MP (pICH10745) proporcionado *in trans*;

* - valor DO 405 muy superior a los valores medibles.

La figura 11 (b) muestra el análisis electroforético y de transferencia de Western en anticuerpos anti-cancerosos expresados en hojas de *N. benthamiana*.

(A) Acumulación de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-canceroso en hojas de *Nicotiana benthamiana* co-infectadas con los pro-vectores de TMV y PVX. La cadena ligera se expresa con PVX y la cadena pesada con TMV. Las proteínas se separan en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. El panel superior muestra la tinción de coomassie; el panel medio muestra una transferencia de Western con anticuerpos de cabra anti-IgG humana (específicos para la cadena gamma) conjugados con HRP (Sigma); el panel inferior muestra una transferencia de Western con anticuerpos de conejo anti-IgG humana conjugados con HRP (específicos para la cadena lambda) (Sigma). No inf, tejido no infectado; 2-11, días post-inoculación; S, patrón de mab (anticuerpo monoclonal) anti-cáncer; LC, cadena ligera expresada

sola con pro-vectores de TMV (6 dpi); HC, cadena pesada expresada sola con pro-vectores de TMV (6 dpi). (B) Purificación de mab anti-cáncer utilizando perlas magnéticas de proteína A (NEB). (A) mab obtenidos de planta (carril 1) y patrón (carril 2) que migran en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones no reductoras en gel teñido con Coomassie.

5 (C) Acumulación de mab anti-cáncer ensamblado en hojas de *Nicotiana benthamiana* co-infectadas con el pro-vector de TMV que expresa la HC y el pro-vector de PVX que expresa la LC.

Las proteínas se separan en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras. La transferencia de Western se sondó con anticuerpos de cabra anti-IgG humana (específicos para la cadena gamma). No inf, tejido no infectado; 10 2-11, días post-inoculación; S, patrón de mab anti-cáncer; LC, cadena ligera expresada sola con pro-vectores de TMV (6 dpi); HC, cadena pesada expresada sola con pro-vectores de TMV (6 dpi). H₂L₂: heterotetrámero de IgG que contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras, H₂L - heterotrímero que contiene dos cadenas pesadas y una ligera, H₂ - homodímero de cadena pesada, L₂ - homodímero de cadena ligera.

15 La figura 12 muestra una representación esquemática de regiones de ADN-T de vectores binarios pICH17620, pICH-FSHA y pICH-FSHB.

La figura 13 muestra una representación esquemática de regiones de ADN-T de vectores binarios pICH17388, pICH-ML-CJ y pICH-MHC.

20

Descripción detallada de la invención

Los vectores virales descritos en la presente invención son vectores virales en los que las subunidades proteicas necesarias para formar dicha hetero-oligomérica están codificadas por al menos dos vectores virales no competitivos diferentes, por lo que cada uno de dichos al menos los dos vectores virales codifica una subunidad proteica diferente necesaria para formar dicha proteína hetero-oligomérica. Cada uno de dichos vectores virales no competitivos puede expresar más de una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica más de una subunidad de proteína hetero-oligomérica recombinante. Dichos vectores virales de ARN se pueden suministrar transitoriamente a la célula vegetal o se pueden incorporar de manera estable en el ADN cromosómico de la planta como precursor o 30 precursores de ADN.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de alto rendimiento de proteínas hetero-oligoméricas en células vegetales. Este procedimiento resuelve las limitaciones de los sistemas de expresión basados en vector viral existentes, tales como limitación de tamaño para secuencias heterólogas que se van a 35 expresar, alta inestabilidad de dichos vectores e incapacidad de co-expresar secuencias de ácido nucleico heterólogas diferentes en la misma célula vegetal. Además, dicho procedimiento proporciona mejores características de bioseguridad, dado que la retirada de la proteína de envuelta viral del sistema evita la formación de partículas virales infecciosas y la reversión a virus de tipo silvestre. Al llevar a la práctica la invención, el diseño del sistema de expresión de alto rendimiento para la proteína hetero-oligomérica de interés es posible para prácticamente cualquier 40 replicón derivado de virus ARN de planta, dicho replicón es adecuado para la expresión de una secuencia heteróloga de interés mediante la modificación de dicho replicón para ser capaz de expresar al menos dos secuencias heterólogas de interés que codifican subunidades diferentes de proteína hetero-oligomérica de interés. Como alternativa se puede encontrar otro vector viral no competitivo que sea capaz de co-replicarse con dicho vector viral en la misma célula vegetal.

45 Los virus ARN de cadena sencilla de sentido positivo (también denominados en este documento "virus ARN" por brevedad) pertenecientes a grupos taxonómicos diferentes son adecuados para construir los vectores virales de ARN de cadena sencilla de sentido positivo (denominados también en este documento "vectores virales" por brevedad) de esta invención. En este documento, un vector viral es un vector de ARN capaz de replicarse en células 50 vegetales, es decir, de formar moléculas de vector de ARN adicionales por polimerización de ARN dependiente de ARN utilizando el vector viral de ARN como un molde. Preferiblemente, los vectores virales de la invención contienen al menos un elemento de secuencia viral que tiene una función viral de ARN, por ejemplo, una replicasa, un promotor subgenómico, un origen de ensamblaje de partícula viral, un ORF de proteína de envuelta o un ORF de proteína de movimiento. Además, el vector viral puede tener un elemento IRES viral de ARN.

55 Un vector viral se puede construir, por ejemplo, a partir del virus del cual se obtiene introduciendo sitios de restricción en el virus, representando dichos sitios de restricción sitios de clonación adecuados para introducir la secuencia heteróloga de la invención. Se comprenderá por el experto habitual que la modificación por ingeniería genética de ácido nucleico en virus o vectores de ARN generalmente se realiza a nivel de ADN utilizando copias de 60 ADN de dichos virus o vectores de ARN, respectivamente. Por lo tanto, es más preciso decir que una copia de ADN de un vector viral de ARN se puede construir a partir de la copia de ADN del virus ARN del cual se obtiene introduciendo sitios de restricción en de la copia de ADN del virus ARN, representando dichos sitios de restricción sitios de clonación adecuados para introducir la copia de ADN de la secuencia heteróloga de la invención a nivel de ADN. Estos asuntos son obvios para un experto habitual y en general no se subrayarán en este documento.

65

Si una copia de ADN de un virus ARN de manera natural tiene: (a) un sitio o sitios de restricción adecuados para clonación, el propio virus puede ser un vector viral. En este documento, la expresión "vector viral" se refiere al caso en el que dicha secuencia heteróloga no está presente en dicho vector o en el caso en el que no está presente en el vector ninguna secuencia que codifique una subunidad proteica de la invención. Los casos en los que dicha secuencia heteróloga o una secuencia que codifica una subunidad proteica de la invención se inserta en dichos vectores virales se identifican especificando explícitamente la presencia de tal inserto.

En este documento se dice que dos vectores virales son diferentes si sus secuencias son diferentes antes de que dichas secuencias heterólogas o una secuencia que codifica una subunidad proteica de la invención se hayan introducido. Se dice que dos vectores virales son iguales si tienen las mismas secuencias antes de que se hayan introducido dichas secuencias heterólogas o una secuencia que codifica una subunidad proteica de la invención. Por lo tanto, dichas secuencias heterólogas o secuencias que codifican las subunidades proteicas de la invención no se toman en consideración cuando se determina si dos vectores virales son diferentes o iguales.

En este documento, las expresiones "replicón" o "replicón viral" tienen el mismo significado que "vector viral".

Se presenta a continuación una lista de los virus ARN que pueden utilizarse para modificar por ingeniería genética los vectores virales de la invención. Los nombres de los taxones entre comillas (y no en cursiva) indican que este taxón no tiene un nombre aprobado internacional por ICTV. Los nombres de las especies (vernáculos) se proporcionan con fuente normal. Los virus sin asignación formal a género o familia están indicados):

Virus ARN:

Virus ARNmc:

Familia: *Bromoviridae*,

Género: *Alfavirus*, Tipo de especie: virus del mosaico de la alfalfa,

Género: *Ilarvirus*, Tipos de especie: virus de la estría del tabaco,

Género: *Bromovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico del bromo,

Género: *Cucumovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico del pepino;

Familia: *Closteroviridae*,

Género: *Closterovirus*, Tipos de especie: virus del amarilleo de la remolacha,

Género: *Crinivirus*, Tipo de especie: virus del amarilleo infeccioso de la lechuga,

Familia: *Comoviridae*,

Género: *Comovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico del frijol chino

Género: *Fabavirus*, Tipo de especie: virus del marchitamiento del habón;

Género: *Nepovirus*, Tipo de especie: virus de la mancha anular del tabaco; **Familia: *Potyviridae*,**

Género: *Potyvirus*, Tipo de especie: virus Y de patata, virus de la viruela del ciruelo; virus del grabado del tabaco; virus de las venas amarillas del trébol; virus del moteado de las venas del tabaco;

Género: *Rymovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico del césped inglés,

Género: *Bymovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico amarillo de la cebada;

Familia: *Sequiviridae*,

Género: *Sequivirus*, Tipo de especie: virus de la mancha amarilla de la chiviría;

Género: *Waikavirus*, Tipo de especie: virus esférico del tungro del arroz;

Familia: *Tombusviridae*,

Género: *Carmovirus*, Tipo de especie: virus del moteado del clavel,

Género: *Dianthovirus*, Tipo de especie: virus de la mancha anular del clavel,

Género: *Machlomovirus*, Tipo de especie: virus del moteado clorótico del maíz,

Género: *Necrovirus*, Tipo de especie: virus de la necrosis del tabaco,

Género: *Tombusvirus*, Tipo de especie: virus del enanismo ramificado del tomate,

Géneros no asignados de virus ARNmc,

Género: *Capillovirus*, Tipo de especie: virus de los surcos del tallo del manzano;

Género: *Carlavirus*, Tipo de especie: virus latente del clavel;

Género: *Enamovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico y excrecencia del guisante,

Género: *Furovirus*, Tipo de especie: virus del mosaico del trigo transportado por el suelo,

Género: *Hordeivirus*, **Tipo de especie:** virus del mosaico del rayado de la cebada,

Género: *Idaeovirus*, **Tipo de especie:** virus de plantas enanas de frambuesa;

Género: *Luteovirus*, **Tipo de especie:** virus de enanismo amarillo de la cebada;

Género: *Marafivirus*, **Tipo de especie:** virus de rayado fino del maíz;

Género: *Potexvirus*, **Tipo de especie:** virus X de patata;

Género: *Sobemovirus*, **Tipo de especie:** virus del mosaico de haba austral,

Género: *Tenuivirus*, **Tipo de especie:** virus de rayado del arroz,

Género: *Tobamovirus*, **Tipo de especie:** virus del mosaico del tabaco,

Género: *Tobravirus*, **Tipo de especie:** virus del rayado y encrespamiento del tabaco,

Género: *Trichovirus*, **Tipo de especie:** virus de la mancha foliar clorótica del manzano;

Género: *Tymovirus*, **Tipo de especie:** virus del mosaico amarillo del nabo,

Género: *Umbravirus*, **Tipo de especie:** virus del moteado de la zanahoria;

Virus ARNmc negativos: Orden: *Mononegavirales*, **Familia:** *Rhabdoviridae*, **Género:** *Cytorhabdovirus*,
Tipo de especie: virus del amarilleo necrótico de la lechuga,

Género: *Nucleorhabdovirus*, **Tipo de especie:** virus de enanismo amarillo de la patata.

Los vectores virales de ARN son capaces de proporcionar un número de copias extremadamente grande de ARN heterólogo asegurando la expresión del gen de interés en una célula vegetal. No obstante, se sabe que tales vectores se vuelven extremadamente inestables si el tamaño de la secuencia de ácido nucleico heteróloga se incrementa más allá de ciertos límites, habitualmente más allá de 1 kb. Debido a tales limitaciones, la aplicación de tales sistemas de vector hasta ahora se ha restringido a la expresión de proteínas de tamaño pequeño a medio relativamente sencillas. Los intentos por expresar proteínas hetero-oligoméricas grandes o complejas no han conducido a un resultado exitoso. Los inventores han encontrado sorprendentemente que los vectores virales pueden adaptarse con éxito para la expresión de alto rendimiento de proteínas hetero-oligoméricas complejas, lo cual hasta ahora no había sido posible. Los primeros intentos de expresar anticuerpo monoclonal de longitud completa (Verch et al., 1998, J. Immunol. Meth., 220, 69-75) no proporcionaron resultados satisfactorios debido a la incompatibilidad de los vectores virales utilizados para la co-expresión de proteínas de interés en la misma célula. En el ejemplo 1 se demuestra a nivel de una sola célula que la co-expresión eficaz de dos genes diferentes (GFP y DsRed) de replicones virales obtenidos del mismo virus ARN de planta (TMV) no es posible. En la figura 1 (A-panel derecho) no se pudieron detectar protoplastos que muestran la expresión de ambos genes indicadores - DsRed y GFP. Un patrón de expresión débil de DsRed en algunos protoplastos en el panel inferior derecho coincide con la fuerte expresión de GFP (panel superior derecho) y es un resultado falso positivo debido a la fuga del filtro utilizado para la detección de DsRed. Esta fuga lleva a una fluorescencia de DsRed débil aparente de protoplastos que contienen altas concentraciones de GFP. Por lo tanto, los replicones de ARN, los cuales son idénticos o comparten regiones extensas de homología no pueden coexistir en una célula vegetal incluso cuando llevan secuencias de ácido nucleico heterólogas diferentes que codifican proteínas recombinantes diferentes. Actualmente no se conoce la razón de este fenómeno. Una posible explicación es que el incremento exponencial en el número de copias de un replicón viral da como resultado una eliminación por competencia rápida del otro replicón viral. De esta manera, un replicón que es el segundo en iniciar la replicación en una célula seleccionada no puede competir con el primero, por lo que los acontecimientos que determinan el "primer" replicón son predominantemente de carácter estadístico.

En los estudios de los inventores para abordar este problema se ha modificado por ingeniería genética un replicón viral de manera tal que dos secuencias de ácido nucleico heterólogo diferentes que codifican proteínas diferentes bajo el control de dos promotores subgenómicos diferentes están presentes en dicho replicón. El esquema general de una región de ADN-T que codifica tal replicón de ARN se muestra en la figura 2. Por conveniencia para el diseño y optimización de tal vector, los inventores han utilizado el enfoque de pro-vector descrito en la solicitud de patente anterior de los inventores (documento WO02088369; véase también Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857). Este enfoque permite el ensamblaje en la planta del vector final a partir de módulos elaborados previamente vía recombinación específica de sitio, por lo tanto, acelerando de manera significativa el diseño del vector y la optimización de vector. El diseño de las construcciones se describe en el Ejemplo 2 y en la figura 3 se muestran representaciones esquemáticas.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que pese al tamaño mayor del inserto en el replicón final y la estructura compleja del vector debido a la presencia de dos promotores subgenómicos fuertes, el replicón de ARN obtenido mostró alta estabilidad en la planta y la capacidad de asegurar la co-expresión de dos proteínas recombinantes diferentes (GFP y DsRed) en la misma célula vegetal. Como se muestra en la figura 4, la frecuencia de co-expresión puede alcanzar prácticamente el 100% de todas las células en áreas infectadas. La sustitución de los genes indicadores (GFP y DsRed), por ejemplo, con las cadenas ligera y pesada de una IgG en tal construcción (figura 5) con expresión adicional en hojas infiltradas de *N. benthamiana* produjo resultados sorprendentes. Como se describe en el Ejemplo 3, un análisis de transferencia de Western mostró una concentración sorprendentemente alta de anticuerpos monoclonales ensamblados (carriles 6 y 7; figura 6). El rendimiento del anticuerpo monoclonal ensamblado proporcionado por el sistema de los inventores es incomparablemente superior al producido por el sistema del estado actual de la técnica (figura 6, carril 4). Hasta lo que se sabe, esta es la primera prueba de la expresión de una proteína hetero-oligomérica compleja como un anticuerpo utilizando un sistema de expresión

basado en vector viral de planta. Todas las publicaciones anteriores estaban restringidas a la expresión de derivados artificiales sencillos de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, para la expresión de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) utilizando vectores virales de TMV (McCormick et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 703-708; McCormick et al., 2003, J. Immunol. Methods, 278, 95-104) y basados en PVX (Smolenska et al., 1998, FEBS Lett., 441, 379-382; Franconi et al., 1999, Immunotechnology, 4, 189-201; Hendy et al., 1999, J. Immunol. Methods, 231, 137-146; Roggero et al., 2001, Protein Expr. Purif., 22, 70-74).

En esta invención, preferiblemente no se utilizan vectores virales sistémicos. En vez de vectores virales sistémicos preferiblemente se sustituye la capacidad del vector viral de moverse sistémicamente por el suministro mediado por *Agrobacterium* de precursores de vector viral en el sistema vegetal. Esto permite sustituir la proteína de envuelta viral con una secuencia heteróloga que se va a expresar. Este enfoque contribuye a la posibilidad de incrementar la capacidad del vector viral de secuencias heterólogas. Al mismo tiempo, este enfoque elimina la probabilidad de que el vector viral se convierta en un virus de tipo silvestre debido a la delección espontánea de secuencias heterólogas, lo que comprometería la productividad del sistema.

Aunque el sistema basado en replicón viral produjo un rendimiento significativamente mejor de anticuerpo monoclonal que los sistemas de la técnica anterior, se examinó la posibilidad de incrementar más el rendimiento al disminuir el tamaño del replicón viral. Considerando que existen posibilidades limitadas de disminuir el tamaño de un replicón viral que expresa dos cadenas de un anticuerpo secretor, se intentó la expresión de las cadenas de anticuerpo pesada y ligera a partir de dos replicones virales diferentes. Considerando que los replicones basados en el mismo virus no son capaces de co-expresar dos secuencias heterólogas diferentes en la misma célula vegetal (véase anteriormente, ejemplo 1) se ensayó la posibilidad de co-expresar dos genes diferentes en la misma célula vegetal clonando por separado los genes de DsRed y GFP en vectores virales obtenidos de los virus de plantas no homólogos virus del mosaico del tabaco (TMV) y Virus X de Patata (PVX) (véase el ejemplo 4). La representación esquemática de las regiones de ADN-T que contienen los ADNc de dichos vectores virales se muestra en las figuras 7 y 8 (únicamente PVX). En el ejemplo 4, por conveniencia, se utilizó un vector viral basado en TMV ensamblado en la planta a partir de módulos de vector vía recombinación específica de sitio. Sorprendentemente, se encontró que los protoplastos aislados de una región de hoja de planta co-infiltrada mostraron prácticamente el 100% de frecuencia de co-expresión de los genes indicadores DsRed y GFP (figura 9).

Recientemente se presentó un estudio acerca de la separación espacial de virus marcados de manera diferente por Dietrich y Maiss (2003, J. Gen. Virology, 84, 2871-2876). En este estudio, las proteínas fluorescentes se expresaron como indicadores. No se menciona la producción de proteínas hetero-oligoméricas. Además, la co-expresión a nivel de protoplastos aislados no se investigó. Dado que los productos de gen indicador pueden difundir a células vecinas vía difusión a través de plasmodesmos, no está disponible información respecto a si los pares seleccionados de virus expresan los genes indicadores en la misma célula o en células vecinas. Las publicaciones anteriores se relacionan con el sinergismo entre virus de tipo silvestre tras la infección de plantas, pero no se relacionan con la expresión de proteínas hetero-oligoméricas en células vegetales (Rochow & Ross, 1955, Virology, 1, 10-27; Goodman & Ross, 1974, Virology, 58, 16-24; Goodman & Ross, 1974, Virology, 59, 314-318; Goodman & Ross, 1974, Virology, 58, 263-271). El desarrollo posterior de estos estudios iniciales sobre las interacciones sinérgicas de virus en plantas co-infectadas (Vance et al., 1995, Virology, 206, 583-590; Pruss et al., Plant Cell, 9, 859-868) llevó al descubrimiento de supresores de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). El desarrollo adicional de sistemas de expresión de proteínas recombinantes se dirigió al estudio de tales supresores de PTGS para la producción mejorada de proteínas recombinantes. No hay indicios en la técnica anterior de la expresión de proteína utilizando sistemas de expresión virales basados en virus sinérgicos.

Esta invención demuestra que los vectores virales no competitivos representan una herramienta eficaz para la producción de proteínas hetero-oligoméricas en células vegetales o en plantas. Dos o más vectores virales son no competitivos entre sí si dichos vectores virales son capaces de replicarse en la misma célula vegetal y no se debilitan mutuamente durante dicha replicación y transfección de otras células. La ausencia de debilitamiento significa que al menos el 10%, de manera preferible el 50%, de manera más preferible el 90% y de manera mucho más preferible el 100% de las células vegetales transfectadas son co-transfectadas, por ejemplo, contienen dichos dos o más vectores virales diferentes. Preferiblemente, dichos vectores virales son capaces de replicarse y expresar secuencias de ácido nucleico heterólogas. De manera más preferible, dichas secuencias de ácido nucleico heterólogas codifican proteínas diferentes. De manera incluso más preferible, dichas proteínas diferentes son subunidades de proteínas hetero-oligoméricas. Con el fin de determinar si los vectores virales son competitivos o no competitivos se puede medir la frecuencia de co-transfección de células vegetales. Esto se puede realizar mediante el siguiente protocolo: se marcan dos vectores virales con dos genes indicadores diferentes, por ejemplo, DsRed y GFP. Dichos vectores marcados de manera diferente se co-suministran (por ejemplo, vía agro-infiltración) al tejido de la hoja de la planta y 3-6 días después, los protoplastos aislados de la región infectada se pueden contar con el fin de determinar la proporción de protoplastos que co-expresan ambos genes indicadores en comparación con el número de la expresión de protoplastos de solo un gen indicador. Los experimentos demuestran que tales mediciones se describen en los ejemplos 2 y 4 (véanse también las figuras 1A y 9). Habitualmente, los vectores virales no competitivos pueden obtenerse de virus que son sinérgicos, por ejemplo, pueden co-transfectar con éxito el mismo hospedador vegetal. Los ejemplos de tales pares de virus ARN sinérgicos incluyen:

Virus X de patata (PVX)/Virus del mosaico del tabaco (TMV);
 PVX/Virus de moteado de la vena de tabaco (TVMV);
 PVX/Virus de grabado de tabaco (TEV);
 PVX/Virus de la vena amarilla de trébol (CIYVV);
 5 PVX/Virus de la viruela del ciruelo (PPV);
 PVX/Virus Y de patata (PVY).

La razón mecánica de la competitividad o la no competitividad de vectores virales no se conoce. Una posible explicación es que los replicones virales obtenidos de vectores virales sinérgicos forman complejos de replicación viral (VRC) (Kawakami et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6291-6296) en diferentes compartimientos subcelulares, por lo tanto, no compiten entre sí por el espacio necesario para formar los VRC. Como se ha establecido experimentalmente, los vectores virales no competitivos se pueden obtener de especies diferentes de virus que son significativamente diferentes a nivel de sus secuencias de ácido nucleico. Dichos vectores virales no competitivos se pueden obtener de virus de plantas sinérgicos que pueden co-infectar con éxito el mismo hospedador vegetal. Los virus sinérgicos habitualmente pertenecen a géneros diferentes. Por ejemplo, PVX pertenece al género Potexvirus, mientras que los virus sinérgicos con el mismo, como TVMV, TEV, PPV y CIEVV pertenecen al género Potyvirus. Otros virus sinérgicos (no competitivos) con virus PVX, como TMV, TVCV y crTMV pertenecen al género Tobamovirus. Evidentemente, la homología de genoma entre representantes de géneros diferentes es más bien baja, habitualmente inferior al 50% de identidad a nivel de ARN.

La clonación de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal en diferentes vectores virales (por ejemplo, basados en PVX y TMV), después de la co-expresión adicional de dichas cadenas en tejido vegetal co-infectado se describe en el Ejemplo 5. Las representaciones esquemáticas de los vectores se muestran en la figura 10. La medición comparativa de ELISA del rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos con la ayuda de este y otros sistemas de expresión mostró el mejor funcionamiento de dicho sistema basado en dos vectores virales no competitivos (figura 11). La expresión eficaz de las proteínas hetero-oligoméricas recombinantes en células vegetales con la ayuda de un vector o vectores virales no se conoce en la técnica anterior.

Basándose en los datos de los inventores, las secuencias obtenidas de virus de los vectores virales no presentan homología suficientemente significativa para considerar que dichos virus están relacionados entre sí. Un ejemplo de tales virus es el par de virus TMV y PVX y los vectores virales basados en los mismos. Estos vectores virales no presentan tal homología. Otro requisito para seleccionar pares de virus aceptables puede ser el sinergismo de virus de tipo silvestre original durante la co-infección de un hospedador vegetal.

Los experimentos expuestos anteriormente se realizaron con sistemas de expresión transitorios basados en suministro de precursor de ADN mediado por *Agrobacterium* en células vegetales. No obstante, una aplicación alternativa de esta invención es para plantas transgénicas con un precursor de ADN de dicho o dichos replicones de ARN incorporados de manera estable en el cromosoma nuclear de la planta. Esto permite resolver muchas limitaciones de sistemas basados en vectores virales vegetales, tales como las restricciones al tamaño máximo de secuencias heterólogas que pueden tolerar los vectores virales. Dado que el precursor de ADN estará presente en cada célula de la planta transgénica, no hay un requisito absoluto de movimiento sistémico o movimiento célula a célula del replicón de ARN (dispersión de replicón). Esto se puede compensar por la alta eficiencia de formación y transporte de los replicones de ARN de la invención en el citoplasma. No obstante, la capacidad del vector de movimiento de célula a célula puede ser de valor adicional dado que la formación del replicón de ARN no siempre se produce en todas las células.

Se pueden utilizar métodos diferentes para proporcionar a una planta, un tejido vegetal o células vegetales ADN heterólogo. Dichos vectores se pueden introducir por transformación en células vegetales por un vector de plásmido Ti transportado por *Agrobacterium* (documentos US 5.591.616; US 4.940.838; US 5.464.763) o bombardeo con partículas o microproyectiles (documentos US 05100792; EP 00444882B1; EP 00434616B1). También se pueden utilizar otros métodos de transformación de plantas como microinyección (documentos WO 09209696; WO 09400583A1; EP 175966B1), electroporación (documentos EP00564595B1; EP00290395B1; WO 08706614A1) o transformación mediada por PEG de protoplastos, etc. La selección del método para el suministro del vector puede depender de la especie vegetal que se va a transformar. Por ejemplo, el bombardeo con microproyectiles generalmente se prefiere para transformación de monocotiledóneas mientras que para que las dicotiledóneas en general se dan mejores resultados con la transformación mediada por *Agrobacterium*.

En los ejemplos de la invención se utiliza el suministro de vectores mediado por *Agrobacterium* transitorio (dicho ADN heterólogo) a células de *Nicotiana*. No obstante, dichos vectores se pueden introducir de manera estable en las plantas de acuerdo con cualquiera de las técnicas convencionales adecuadas para transformación estable o transitoria de las especies vegetales de interés. Las técnicas de transformación para dicotiledóneas son bien conocidas en la técnica e incluyen técnicas basadas en *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas sin *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por protoplastos o células. Estas técnicas incluyen captación mediada por PEG o electroporación, suministro mediado por bombardeo de partículas y microinyección. Los ejemplos de estas técnicas se describen en Paszkowski et al., EMBO J 3, 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199, 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986)

y Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneradas hasta plantas completas utilizando técnicas convencionales.

5 La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas debido a su alta eficiencia de transformación y su amplia utilidad con muchas especies diferentes. Las muchas especies de cultivo que pueden transformarse habitualmente por *Agrobacterium* incluyen tabaco, tomate, girasol, algodón, colza, patata, soja, alfalfa y chopo (documento EP 0 317 511 (algodón), documento EP 0 249 432 (tomate), documento WO 87/07299 (*Brassica*), patente US 4.795.855 (chopo)).

10 En los ejemplos de esta invención se empleó el suministro de ADN-T mediado por *Agrobacterium* para la expresión transitoria de un gen o genes de interés (Vaquero et al., 1999, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96, 11128-11133). Este método es una herramienta extremadamente útil no solo para sistemas de producción de proteína recombinante a escala de pequeña a media, sino también para la expresión a gran escala.

15 La liberación del precursor de replicón viral incorporado de manera estable en el ADN cromosómico de la planta se puede conseguir utilizando promotores inducibles o cualquier otro promotor regulado (por ejemplo, regulado por el desarrollo). Los promotores inducibles se pueden dividir en dos categorías de acuerdo con sus condiciones de inducción: los inducidos por factores abióticos (temperatura, luz, sustancias químicas) y los que pueden inducirse por factores bióticos, por ejemplo, ataques de patógenos o plagas. Los ejemplos de la primera categoría son
20 promotores inducibles por calor (documento US 05187287) e inducibles por frío (documento US05847102), un sistema inducible por cobre (Mett et al., 1993, Proc Natl. Acad. Sci., 90, 4567-4571), sistemas inducibles por esteroides (Aoyama & Chua, 1997, Plant J., 11, 605-612; McNellis et al., 1998, Plant J., 14, 247-257; documento US06063985), un sistema inducible por etanol (Caddick et al., 1997, Nature Biotech., 16, 177-180; documento WO09321334) y un sistema inducible por tetraciclina (Weinmann et al., 1994, Plant J., 5, 559-569). Uno de los
25 últimos desarrollos en el área de sistemas inducibles químicamente para plantas es un promotor quimérico que puede activarse por el glucocorticoide dexametasona y desactivarse por tetraciclina (Bohner et al., 1999, Plant J., 19, 87-95). Para una revisión de sistemas químicamente inducible véase: Zuo & Chua (2000, Current Opin. Biotechnol., 11, 146-151) y Padidam, M (2003, Curr. Opin. Plant Biol., 6, 169-177). Otros ejemplos de promotores inducibles son promotores que controlan la expresión de genes relacionados con la patogenia (PR) en plantas. Estos
30 promotores pueden inducirse por tratamiento de una planta con ácido salicílico, un componente importante en las rutas de señalización de la planta en respuesta al ataque por patógenos u otros compuestos químicos (benzo-1,2,3-tiadiazol o ácido isonicotínico), que son capaces de activar la expresión del gen PR (documento US05942662).

Esta invención no se limita a vectores basados en TMV y PVX descritos en los ejemplos, sino que es aplicable a
35 replicones obtenidos de otros virus ARN de plantas, sometidos al establecimiento de sistemas de expresión obtenidos de dichos replicones virales. El sinergismo mejor estudiado en plantas co-infectadas se conoce para el par PVX/PVY de virus (Rochow & Ross, 1955, Virology, 1, 10-27; Goodman & Ross, 1974, Virology, 58, 16-24). Es muy probable que muchos de estos virus puedan correplicarse en la misma célula vegetal. Dietrich & Maiss (2003, J. Gen. Virol., 84, 2871-2876) han demostrado que pares de virus marcados de manera diferente, por ejemplo, el virus de la viruela del ciruelo (PPV) y el virus X de patata (PVX), el virus del moteado de la vena de tabaco (TVMV) y PVX,
40 el virus de la vena amarilla del trébol (CIYVV) y PVX pueden co-expresar genes indicadores diferentes en la misma región infectada del tejido vegetal. Utilizando la estrategia descrita en esta invención, se pueden desarrollar sistemas de expresión de proteína hetero-oligomérica recombinante para prácticamente cualquier par de replicones obtenidos de virus ARN de cadena sencilla de sentido positivo de planta que sea capaz de correplicarse en la misma célula
45 vegetal. Por ejemplo, los vectores virales basados en virus del mosaico de la alfalfa (AMV) del género alfamovirus se pueden utilizar en esta invención.

Los genes de interés que codifican proteínas complejas (hetero-oligoméricas) sus fragmentos (funcionales o no
50 funcionales) y sus derivados artificiales y fusiones se pueden expresar en plantas o células vegetales utilizando la presente invención. Se pueden producir y purificar utilizando la invención muchos grupos comercialmente valiosos de proteínas hetero-oligoméricas. Estos grupos incluyen, pero sin limitación, proteínas industriales y de investigación así como proteínas para aplicaciones en el área de la salud humana o animal. No obstante, el más preferido es el grupo de proteínas de respuesta inmunológica, específicamente anticuerpos monoclonales que se seleccionan de diferentes clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgD) y sus derivados sintéticos como las versiones mutantes
55 y diferentes tipos de fusiones con otras proteínas o partes de las mismas.

Ejemplos

60 Se presentan los siguientes ejemplos para ilustrar la presente invención. Pueden realizarse modificaciones y variaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Los ejemplo 1 a 3 son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1

65 *Carencia de co-expresión de GFP y DsRed de dos vectores virales de ARN basados en TMV que se obtienen del mismo virus ARN de planta*

Se infectó tejido de hojas con dos vectores virales basados en TMV obtenidos del mismo virus ARN de planta pero que contienen dos genes diferentes de interés (figura 1). Se ensayó este enfoque utilizando los genes marcadores visuales GFP y DsRed clonados en un vector viral basado en TMV. La primera construcción, pICH17272 (véase la figura 1 de Marillonnet et al., 2005, Nat. Biotechnol., 23, 718-723) contiene GFP y es similar a pICH18711 (véase la solicitud internacional de patente PCT/EP03/12530, publicada como documento WO 2005049839; Marillonnet et al., 2005, Nat. Biotechnol., 23, 718-723) con la excepción de que la secuencia codificante de RdRP en el vector contiene 9 intrones de planta en vez de 14. El pICH18722 (Marillonnet et al., 2005, Nat. Biotechnol., 23, 718-723) se construye sobre la estructura principal de dos cepas relacionadas estrechamente de TMV, Cr-TMV (Dorokhov et al., 1994 FEBS Lett. 350, 5-8) y TVCV (Lartey et al., 1994, Arch. Virol. 138, 287-298) y contiene el genoma viral colocado bajo el control de un promotor de planta, con la secuencia de proteína de envuelta sustituida por una secuencia heteróloga. La presencia de 11 intrones en RdRP y MP incrementa la eficacia del inicio de la replicación viral después del suministro mediado por *Agrobacterium* del vector al tejido de la hoja y por lo tanto incrementa la probabilidad de co-expresión de los dos vectores virales en la misma célula. El pICH18505 es similar a pICH17272 excepto por que se ha sustituido la secuencia codificante de GFP por la secuencia codificante de DsRed utilizando sitios de restricción Xho 1-Not 1 (figura 1). Los mapas de restricción detallados de las regiones de ADN-T de pICH18505 y pICH17272 se muestran en la figura 1C. pICH17272 y pICH18505 se transforman en *Agrobacterium* cepa GV3101 y el tejido de hoja se infiltró en *Nicotiana benthamiana* como se ha descrito previamente (Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857). Los protoplastos se prepararon a partir del área infiltrada 7 días post-infiltración (dpi) y se observaron bajo luz azul o roja bajo el microscopio. Muy pocos protoplastos expresaron tanto GFP como DsRed (figura 1A), incluso cuando los protoplastos se prepararon a partir del área infiltrada varios días después. Esto sugiere que una vez que una célula se infecta con un primer vector viral basado en TMV, se vuelve incapaz de reinfectarse por un segundo vector basado en TMV.

Ejemplo 2

25 *Co-expresión de GFP y DsRed a partir de un replicón viral único*

Dos genes de interés se expresaron a partir de un vector viral de ARN bajo el control de dos promotores subgenómicos separados (figura 2). Ambos promotores subgenómicos pueden ser idénticos, pero para evitar el riesgo de delección entre secuencias repetidas en la construcción durante la replicación viral se prefiere utilizar promotores subgenómicos de cepas de TMV relacionadas; en este caso, el segundo promotor subgenómico y la región no traducida 3' provienen de TMGMV cepa U5 (Shivprasad et al., 1999, Virology, 255, 312-323; Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857). Además, por conveniencia de clonación se clonaron GFP y DsRed en provectores virales (descritos en el documento WO02/088369 y por Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857) en vez de un vector ensamblado completo. Los dos provectores, pICH17388 y pICH15933 (figura 3), se convirtieron en un vector viral basado en TMV completamente funcional mediante recombinación específica de sitio entre ambos módulos de provector *in planta*. pICH17388 es similar a pICHNOP (Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857) con la excepción de que están presentes 11 intrones en las secuencias virales (como en pICH17272). pICH15933 es equivalente a pICHGFPSYS (Marillonnet et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6852-6857) excepto por que la secuencia codificante de TMGMV U5 estaba sustituida por la secuencia codificante de DsRed.

Se transformó pICH15933 en *Agrobacterium* cepa GV3101 y se infiltró en hoja de *Nicotiana benthamiana* junto con pICH17388 y pICH10881 (figura 3). Cinco días después de la infiltración, todos los focos que expresaban GFP también expresaban DsRed, lo que muestra excelente co-expresión de los dos genes en las mismas células vegetales (figura 4).

Ejemplo 3

50 *Expresión de un anticuerpo a partir de un replicón viral único*

Las secuencias codificantes de GFP y DsRed en pICH15933 se sustituyeron por las cadenas ligera y pesada del anticuerpo IgG, respectivamente, lo que da como resultado la construcción pICH20241 (figura 5). Como un control, las cadenas pesada y ligera se clonaron en un provector basado en TMV, sustituyendo la secuencia codificante de pICH1740, dando como resultado las construcciones pICH20421 y pICH20431 (figura 5). pICH20241 se coinfiltró en hojas de *Nicotiana benthamiana* junto con pICH17388 y pICH10881 (figura 3).

El análisis de transferencia de Western de la proteína soluble total extraída de hojas infiltradas se realizó con anticuerpos de conejo anti-IgG humana diluidos 1:6000 marcados con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Sigma). Los resultados del análisis se muestran en la figura 6A. Es evidente que el nivel de expresión de un anticuerpo conseguido con la ayuda de un vector viral único (carriles 6 y 7, figura 6) es significativamente mayor que el conseguido con la ayuda de un promotor constitutivo fuerte incluso en presencia del supresor de PTGS P19 (carriles 3-4, figura 6).

65 **Ejemplo 4**

Las cadenas pesada y ligera de IgG se clonaron en un vector de PVX, sustituyendo la secuencia codificante de GFP en pIC0130, generando dos construcciones, pICH21240 y pICH21370, que contenían ya sea la cadena pesada o la ligera, respectivamente (figura 10A). Los clones de las partes de provector de TMV que contenían ya sea la cadena ligera o la pesada del anticuerpo también se construyeron (pICH20431 y pICH20421, figura 10A). La mezcla de agrobacterias que proporcionaba dos cadenas diferentes que se expresaban a partir de vectores basados en PVX y TMV se infiltró en hojas de *N. benthamiana* y se midió el nivel de expresión de anticuerpos por ELISA 10 días después de la inoculación. Los resultados (figura 11) muestran un nivel extremadamente alto de anticuerpos funcionales ensamblados en caso de co-expresión de las cadenas pesada y ligera a partir de los vectores basados en PVX y TMV. Estos niveles eran significativamente mayores que los obtenidos a partir de un vector de TMV que expresaba ambas cadenas (EJEMPLO 3).

Otro anticuerpo monoclonal específico de tumor humano que pertenece a la subclase IgG1, mab anti-cáncer, se subclonó en vectores basados en TMV y PVX como sigue: El fragmento de NcoI-NotI 730 que contenía la secuencia codificante de la cadena ligera de mab anti-cáncer se volvió romo en el sitio NotI y se ligó en el vector de clonación de módulo 3' basado en TMV pICH11599 (figura 10B) abierto con NcoI-XbaI y se unió con extremos romos en el sitio XbaI dando como resultado pICH21910 (figura 10B). Se utilizó la misma estrategia para subclonar el fragmento de NcoI-NotI de 1421 pb con la secuencia codificante de la cadena pesada de mab anti-cáncer en pICH11599 (figura 10B) dando como resultado la construcción pICH21920 (figura 10B). El módulo 3' basado en PVX para la expresión de GFP pICH21282 (figura 10C) se generó basándose en el vector de clonación del módulo 3' basado en TMV pICH10990 (figura 10C). Se consiguió en varias etapas de clonación vía la inserción de la secuencia codificante de GFP dentro de pICH10990 (figura 10C) y la sustitución consecuente de la región no traducida 3' de TMV con la región no traducida 3' de PVX. De manera similar, el módulo de pro-vector 3' basado en TMV pICH21920 (figura 20B) se convirtió en la construcción de pro-vector 3' basado en PVX pICH22250 (figura 10C) por sustitución de la región no traducida 3' de TMV con la región no traducida 3' de PVX. Esto se consiguió por ligación del fragmento de HindIII-NdeI de 575 pb de pICH21282 (figura 10C) unido por extremos romos en el sitio HindIII con el fragmento de Sall-NdeI de pICH21920 unido por extremos romos en el sitio Sall. Se subclonó un fragmento de NcoI-EcoRI de 723 pb que contenía la secuencia codificante de la cadena ligera de mab anti-cáncer en pICH22250 (figura 10C) digerido con NcoI-EcoRI, dando como resultado pICH22240 (figura 10C).

El provector 5' pICH21380 (figura 10D) se elaboró de la siguiente manera: se utilizó la construcción pICH17388 (figura 3B) como molde para amplificar por PCR el fragmento con la ayuda de los cebadores pv5p5F (SEC ID N°: 9) (5' cagctagcaa caaacaagaa agtaagttt c-3') y pv5p5R (SEC ID N°: 10) (5'-tctgagctct gcatgctacg ccccaactg agag-3'), digerido con las enzimas de restricción *Nhe1* y *Sac1* y ligado con el fragmento de *Nhe1-Sac1* grande de pICH20788, sustituyendo la parte 3' del vector PVX con el extremo 5' del intrón y el sitio de recombinación AttP. El esquema de clonación se muestra en la figura 10D. La estrategia de utilizar provectores 5' con provectores 3' para ensamblar un vector viral en la planta por medio de recombinación específica de sitio fue como se ha descrito anteriormente (Marillonnet et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 6852-6857).

Procedimiento de agroinfiltración

Todas las construcciones resultantes se transformaron en *Agrobacterium* cepa GV3101 utilizando un protocolo de electroporación convencional y se utilizaron para agroinfiltración adicional de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Volúmenes iguales de cultivos de *Agrobacterium* que han crecido durante una noche, DO_{600} que varía de 1,8 a 2,5, se mezclaron y sedimentaron a 6000 g durante 3 min. El sedimento se resuspendió en una solución que contenía MES 10 mM (pH 5,5) y $MgSO_4$ 10 mM, dando como resultado una dilución 10^{-1} para cada cultivo individual. Se infiltraron hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* cultivadas en invernadero de 6-8 semanas de edad mediante la utilización de una jeringa sin aguja. En el caso de utilización de provectores para la agroinfiltración, la mezcla agrobacteriana habitualmente transportaba 5 cepas agrobacterianas diferentes, proporcionando cada una uno de los siguientes componentes: fuente de recombinasa (integrasa) (pICH10881); provector 5'PVX (pICH21380); un provector 3' PVX que proporcionaba una de las cadenas de IgG (ya sea pICH22250 para la cadena pesada o pICH22240 para la cadena ligera, dependiendo de la cadena complementaria proporcionada por el provector de TMV); provector 5' TMV (pICH17388); un provector 3' TMV (ya sea pICH21910 que codifica la cadena ligera o pICH21920 que codifica la cadena pesada).

SDS-PAGE y transferencia de Western

Se molieron en nitrógeno líquido muestras de 100 mg de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con *Agrobacterium* con 300 μ l de tampón de extracción de proteína (Tris 0,1 M, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,1%, pH 8,0). Los extractos de hojas crudas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (condiciones no reductoras) o al 12% (condiciones reductoras) utilizando el sistema de tampón de Laemmli seguido por tinción con Azul Brillante de Coomassie. Para análisis de transferencia de Western, las proteínas de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a una membrana Hybond P (Amersham Biosciences, RU) utilizando Tampón de Transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%, pH 8,3). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBST (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 7,4) y se sondaron con anticuerpos de cabra anti-cadena ligera lambda humana conjugados con HRP (Sigma, RU) o anticuerpo de cabra anti-cadena gamma de IgG humana específicos conjugados con HRP (Sigma, RU), diluidos en leche desnatada al 2,5%/TBS 1:10000 y 1:5000, respectivamente.

Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo de detección ECL (Amersham Biosciences, RU). Los resultados de las separaciones electroforéticas y de los análisis de transferencia de Western se muestran en la figura 11B. La comparación con patrón de IgG mostró que el rendimiento de anticuerpos monoclonales en tejido vegetal alcanza 0,2-0,35 mg por gramo de biomasa de hoja fresca.

5

Aislamiento de mab recombinantes obtenidos de plantas

Las proteínas solubles totales se extrajeron de áreas de hoja de *Nicotiana benthamiana* agroinoculadas con tampón que contenía fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05% (pH 8,0). El aislamiento a pequeña escala de mab anti-cáncer a partir de extractos de proteína cruda se realizó utilizando purificación de afinidad de una etapa con perlas magnéticas de proteína A (New England Biolabs, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El gel teñido con Coomassie con los Mab obtenidos de plantas purificados se muestra en la figura 11B (panel B).

10

15 **Ejemplo 6**

Expresión de hormona estimulante del folículo (FSH) con vectores basados en TMV y PVX

Los genes (ADNc) que codifican los polipéptidos alfa (nucleótidos que corresponden con las secuencias codificantes 101-463 de GenBank Acc. N° NM_173901) y beta (nucleótidos que corresponden con las secuencias codificantes 70-459 de GenBank Acc. N° NM_174060) de FSH bovina se sintetizaron flanqueados con sitios de restricción (5'NcoI-3'EcoRI para las subunidades FSH-alfa y FSH-beta) y se clonaron en el pro-vector de TMV (pICH20431, derivado de pICH11599, figura 10B) y el vector PVX (pICH21240), sustituyendo las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera de IgG y generando dos construcciones, pICH-FSHA y pICH-FSHB, que contenían las secuencias que codifican la subunidad alfa y la subunidad beta, respectivamente (figura 12). La mezcla de agrobacterias que proporcionan dos subunidades diferentes expresadas de vectores basados en PVX y TMV se prepararon e infiltraron en hojas de *N. benthamiana* como se ha descrito anteriormente y el nivel de expresión de FSH heterodimérica se midió por ELISA 10 días después de la inoculación utilizando anticuerpos específicos de dímero de FSH disponibles en el mercado (FSH117) y se detectó con el sistema quimioluminiscente Tropix (Tropix, Bedford, MA).

20

25

30

Ejemplo 7

Expresión de IgM con vectores basados en TMV y PVX

Las secuencias codificantes de GFP y DsRed en pICH15933 se sustituyeron por las secuencias que codifican las cadenas ligera y J de IgM, respectivamente, dando como resultado la construcción pICH-MLCJ (figura 13). El gen que codifica la cadena pesada de IgM se clonó en el vector PVX (pICH21240), sustituyendo las secuencias codificantes de la cadena pesada de IgG y generando la construcción pICH-MHC (figura 13). La mezcla de agrobacterias que proporcionaba tres cadenas diferentes de IgM expresadas de vectores basados en PVX y TMV se infiltró en hojas de *N. benthamiana* y se midió el nivel de expresión del complejo hetero-oligomérico por medio de ELISA 10 días después de la inoculación utilizando anticuerpos específicos de IgM disponibles en el mercado.

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción en una planta, tejido vegetal o células vegetales de una proteína hetero-oligomérica que comprende al menos una primera y una segunda subunidad proteica, comprendiendo dicho procedimiento expresar en células vegetales al menos dicha primera y dicha segunda subunidad proteica proporcionando a dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales un primer y un segundo vector viral de ARN de cadena sencilla de sentido positivo, codificando dicho primer vector viral al menos dicha primera subunidad proteica, codificando dicho segundo vector viral al menos dicha segunda subunidad proteica, por lo que dicho primer vector viral y dicho segundo vector viral son
- (a) vectores virales no competitivos ya que no se obtienen de virus de la misma especie de virus;
- (b) vectores virales no competitivos ya que difieren en partes de secuencia diferentes de las partes de secuencia que codifican dicha primera y dicha segunda subunidad proteica;
- (c) vectores virales no competitivos ya que el o los ORF de replicasa de dicho primer vector viral y el o los ORF de replicasa de dicho segundo vector viral tienen una homología como máximo del 90%; o
- (d) vectores virales no competitivos ya que el o los ORF de replicasa de dicho primer vector viral y el o los ORF de replicasa de dicho segundo vector viral tienen una identidad como máximo del 85%.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, seguido por el aislamiento de dicha proteína hetero-oligomérica de dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho primer vector viral contiene una primera secuencia heteróloga que codifica dicha primera subunidad proteica y dicho segundo vector viral contiene una segunda secuencia heteróloga que codifica dicha segunda subunidad proteica, por lo que la expresión de dicha primera y/o dicha segunda subunidad proteica está bajo el control de un promotor subgenómico.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho primer vector viral contiene una primera secuencia heteróloga que codifica dicha primera subunidad proteica y dicho segundo vector viral contiene una segunda secuencia heteróloga que codifica dicha segunda subunidad proteica, por lo que la expresión de dicha primera y/o dicha segunda subunidad proteica está bajo el control de un elemento IRES.
5. El procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho primer vector viral y/o dicho segundo vector viral carece o carecen de un ORF de proteína de envuelta funcional, un ORF de proteína de movimiento funcional y/o un origen funcional de ensamblaje de partícula viral.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho primer vector viral se obtiene de un virus que pertenece al género Potexvirus y dicho segundo vector viral se obtiene de un virus que pertenece al género Potyvirus.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho primer vector viral se obtiene de Virus X de Patata y dicho segundo vector viral se obtiene del Virus Y de Patata.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho primer vector viral se obtiene de un virus que pertenece al género Potexvirus y dicho segundo vector viral se obtiene de un virus que pertenece al género Tobamovirus.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho primer vector viral se obtiene del Virus X de Patata y dicho segundo vector viral se obtiene del Virus del Mosaico del Tabaco.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho primer y dicho segundo vector viral tienen como máximo el 60% de homología de secuencia.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha proteína hetero-oligomérica es un anticuerpo.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho o dichos vectores virales se proporcionan de manera transitoria a dicha planta, tejido vegetal o células vegetales.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho o dichos vectores virales se proporcionan de manera transitoria a dicha planta, tejido vegetal o células vegetales por transfección con *Agrobacterium*.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho o dichos vectores virales de ARN se incorporan de manera estable en el ADN cromosómico de la planta como precursores de ADN de dichos vectores virales de ARN.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la liberación controlada de dicho o dichos

vectores virales de ARN de dichos precursores de ADN se proporciona por promotores inducibles.

- 5 16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que al menos dicha primera o dicha segunda subunidad proteica tiene un péptido señal específico de planta como una señal de direccionamiento de ER.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dichos péptidos señal específicos de planta se obtienen de calreticulina de tabaco y/o alfa-amilasa de arroz.
- 10 18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es una inmunoglobulina que comprende al menos una parte de un dominio de unión a antígeno.
- 15 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 18, en el que dicho anticuerpo comprende una proteína de protección en asociación con una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la proteína de protección comprende una parte de un receptor de poliinmunoglobulina.
- 20 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 18 o 19, en el que dicho anticuerpo o su derivado pertenece a la clase de inmunoglobulina G, a la clase de inmunoglobulina A, a la clase de inmunoglobulina M, a la clase de inmunoglobulina D o a la clase de inmunoglobulina E.
- 25 21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha proteína hetero-oligomérica es insulina.
22. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que al menos una o al menos dos o más subunidades de dicha proteína hetero-oligomérica contiene una señal de retención en retículo endoplásmico KDEL.
- 30 23. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dichas secuencias de ácido nucleico heterólogas se mutan con el fin de eliminar parcial o completamente los sitios de glucosilación de dicha proteína hetero-oligomérica.
- 35 24. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 23, en el que dicha planta, tejido vegetal o célula vegetal se modifica por ingeniería genética para alterar el patrón de glucosilación de dicha proteína hetero-oligomérica.
- 40 25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que dicha planta es una planta monocotiledónea o dicotiledónea.
26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea pertenece a la familia *Solanacea*.
- 45 27. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea es una especie de *Nicotiana*.
28. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea es *Nicotiana tabacum* o *Nicotiana benthamiana*.
- 50 29. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea pertenece a la familia *Brassicacea*.
30. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea pertenece a la familia de las leguminosas.
- 55 31. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea es *Medicago sativa*.
32. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea pertenece a la familia *Chenopodiaceae*.
- 60 33. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicha planta dicotiledónea es *Beta vulgaris*.
- 65 34. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar a dicha planta, dicho tejido vegetal o dichas células vegetales por transfección mediada por *Agrobacterium* un precursor de ADN de dicho primer vector viral de ARN de cadena sencilla de sentido positivo y un precursor de ADN de dicho segundo vector viral de ARN de cadena sencilla de sentido positivo, por lo que al menos dicho primer vector viral o dicho segundo vector viral carecen de un marco de lectura abierto que codifica una proteína funcional necesaria para movimiento sistémico de dicho primer o dicho segundo vector viral en dicha planta.

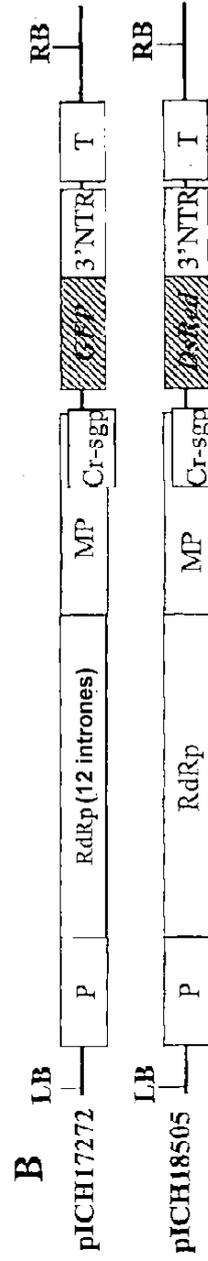
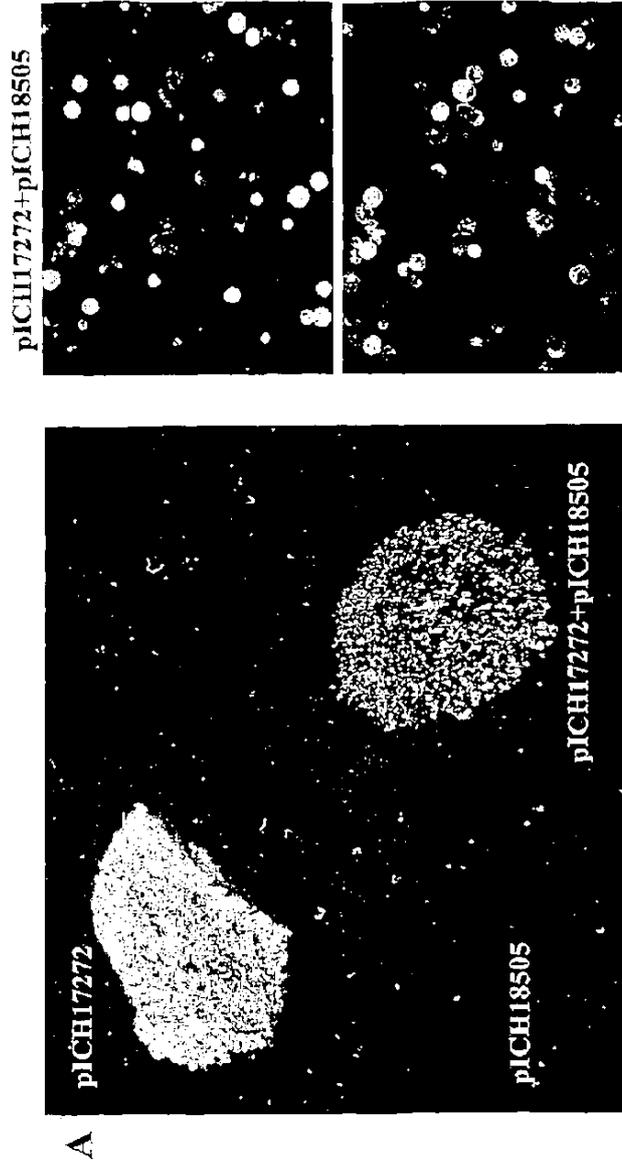


Figura 1 (A,B)

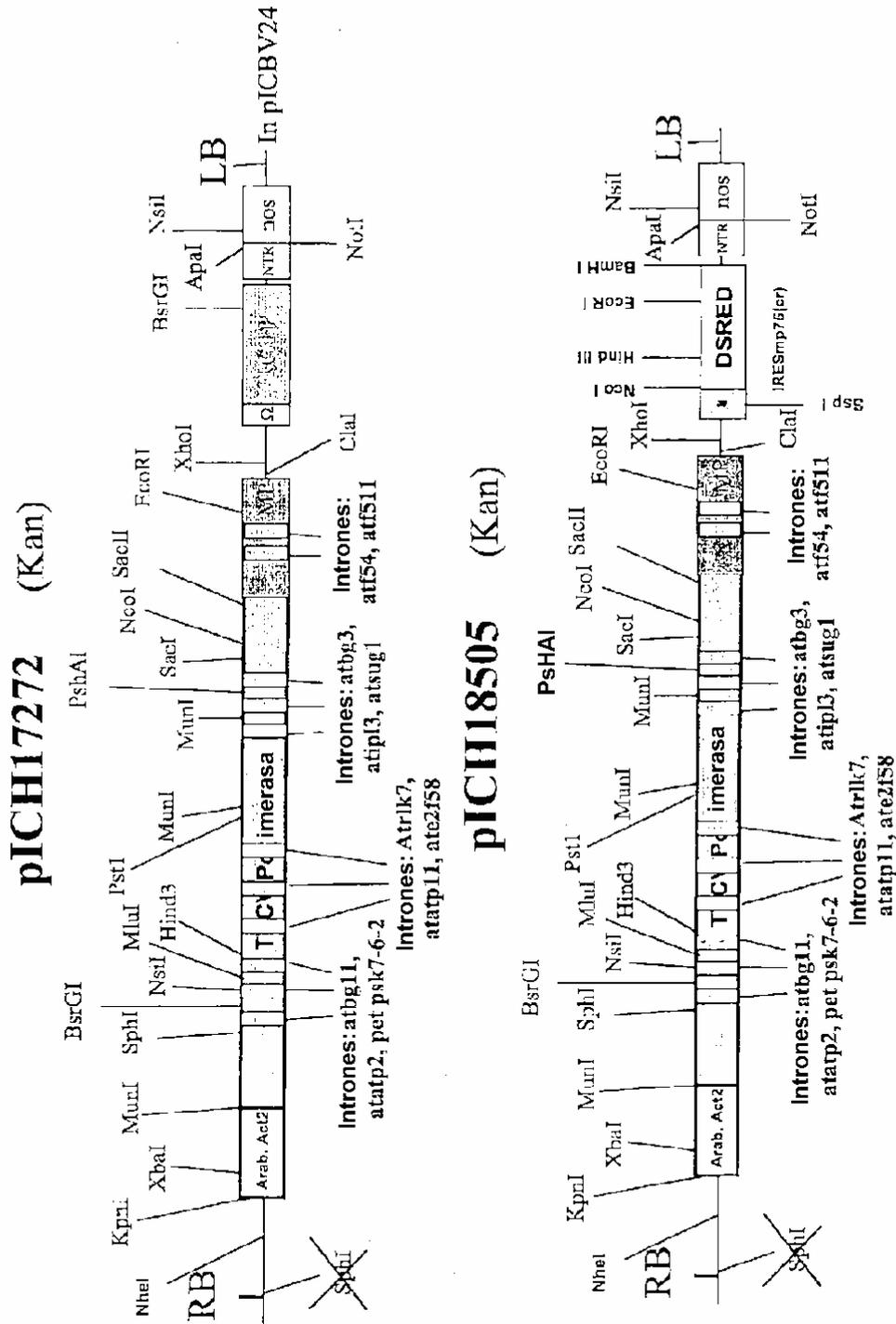


Fig. 1(C)

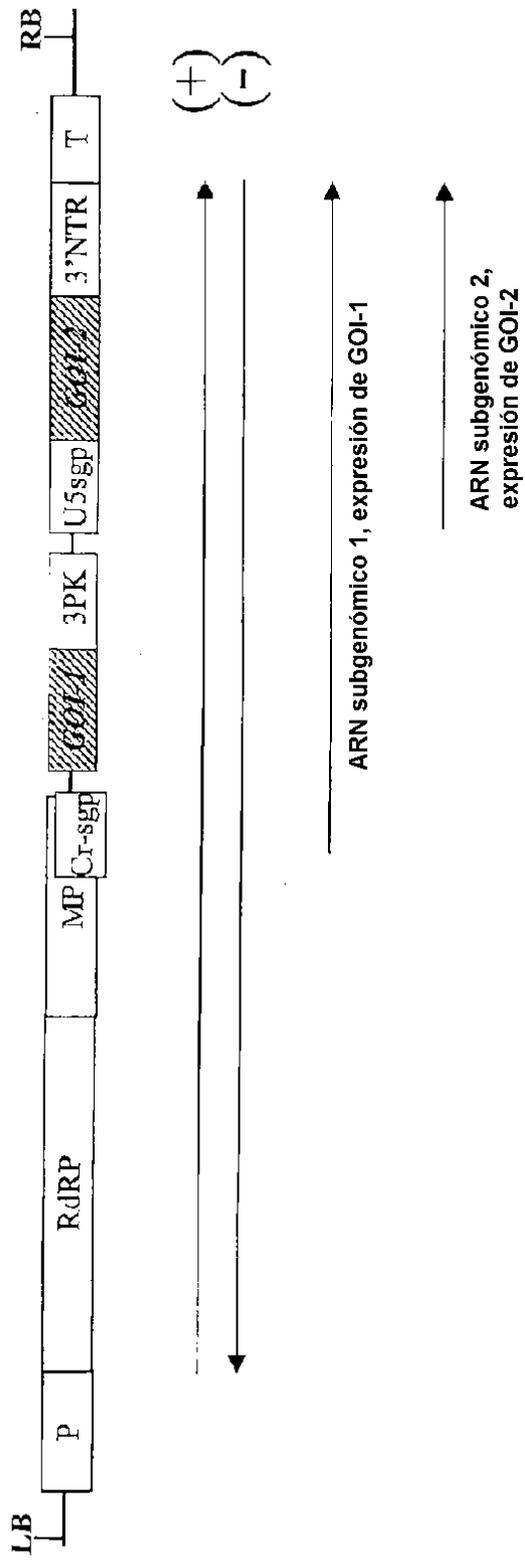


Figura 2

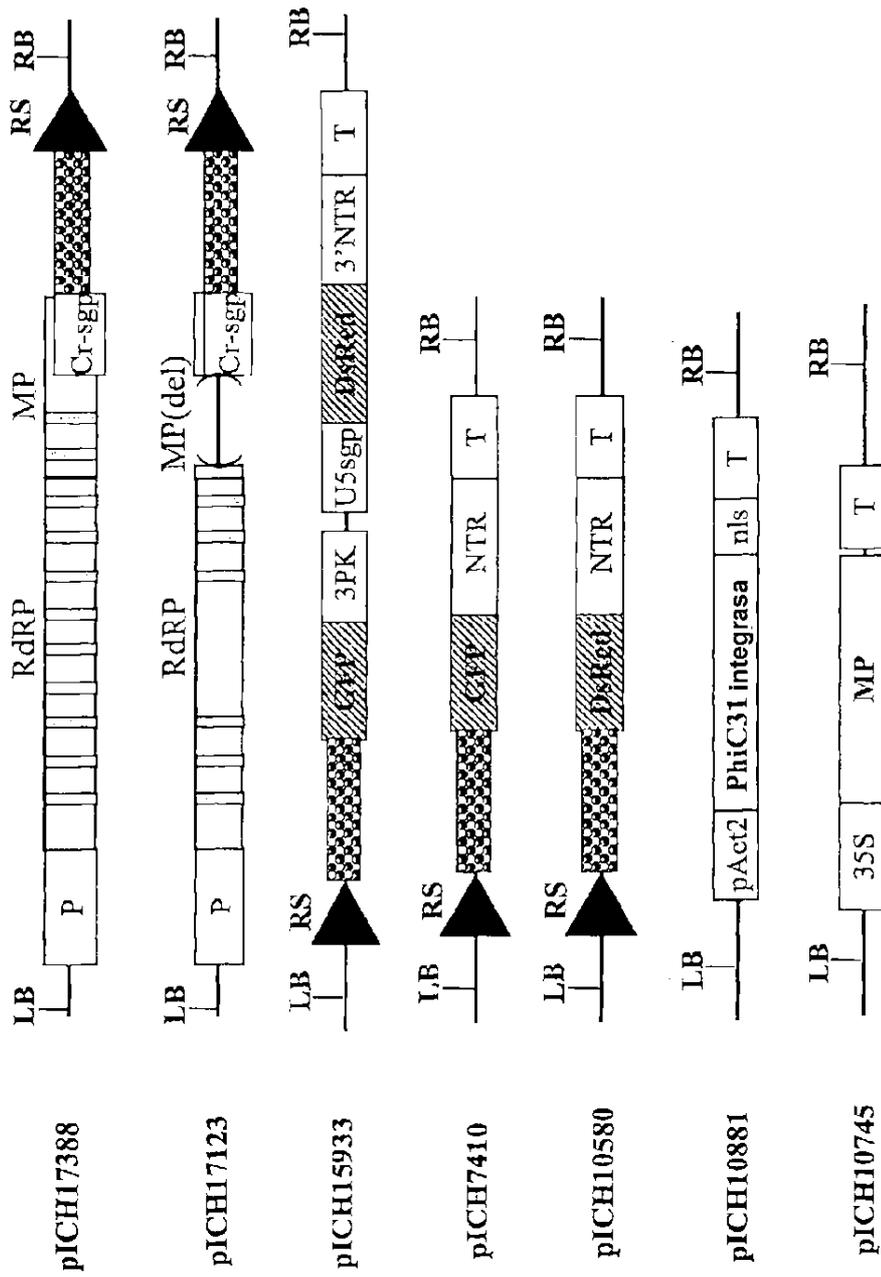
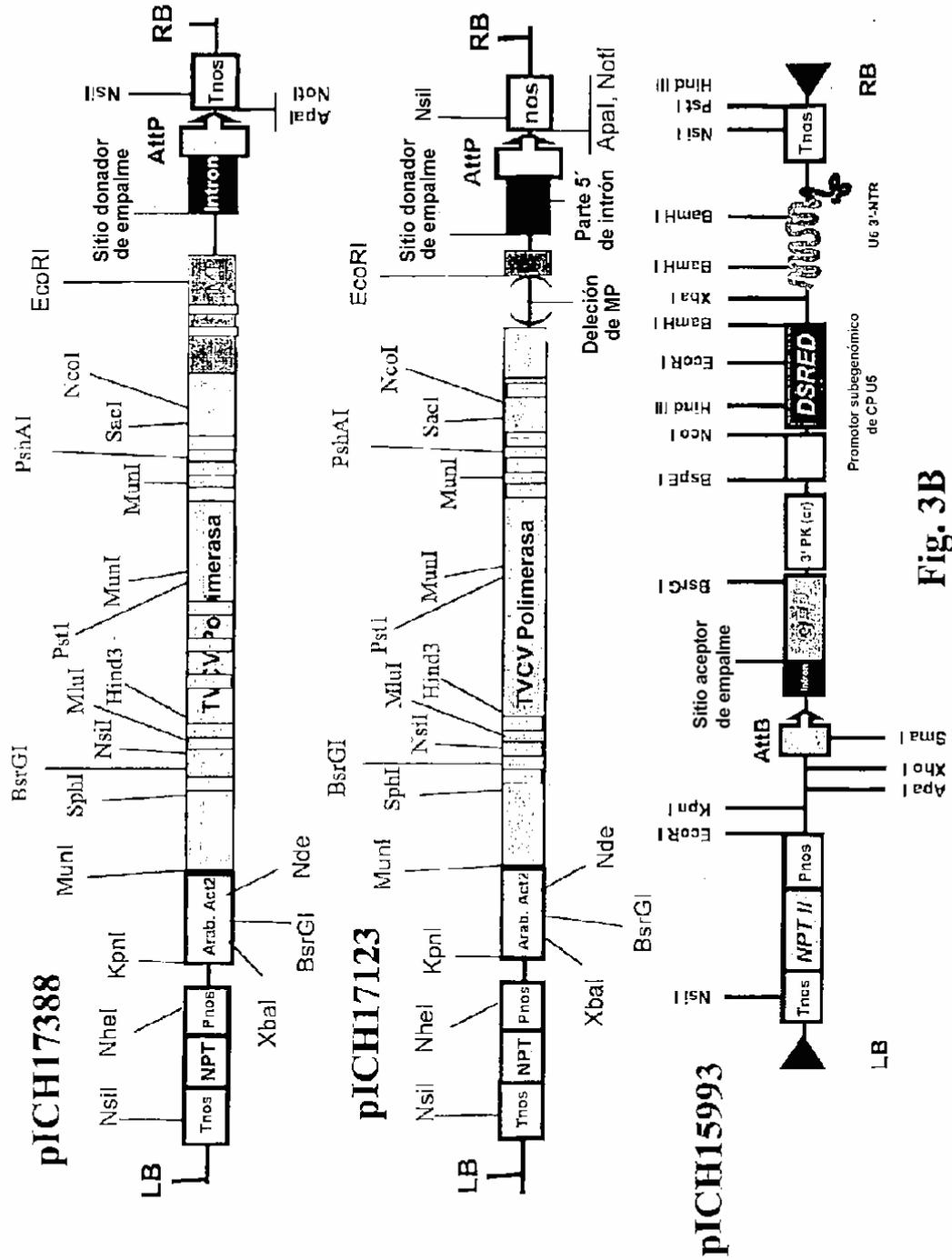


Figura 3A



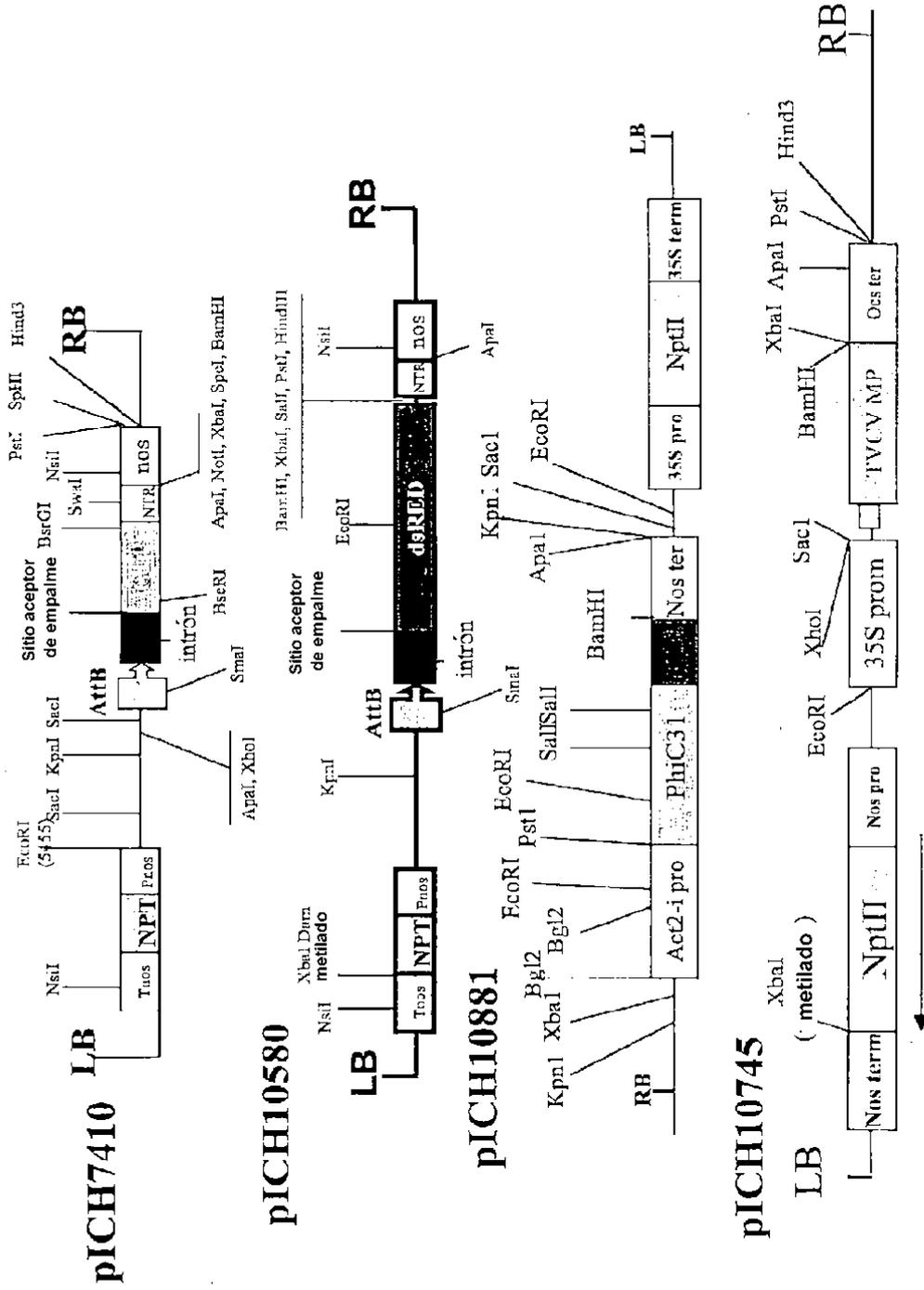


Fig. 3C

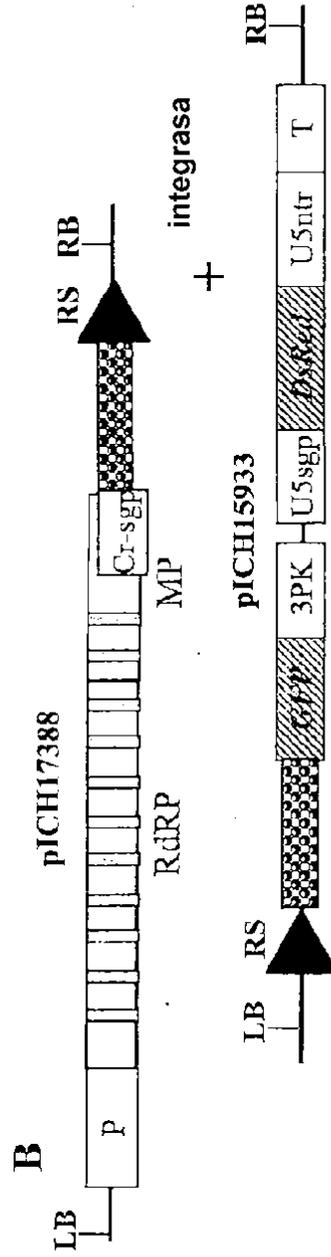
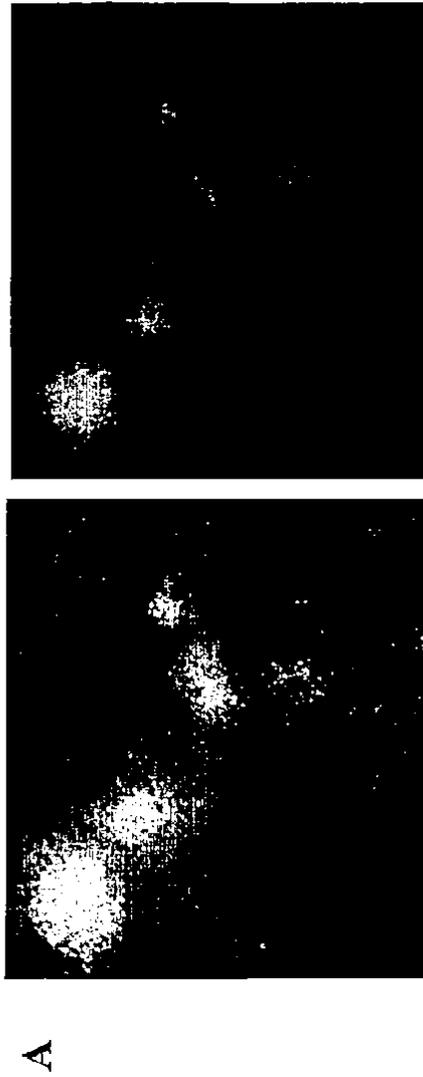


Figura 4

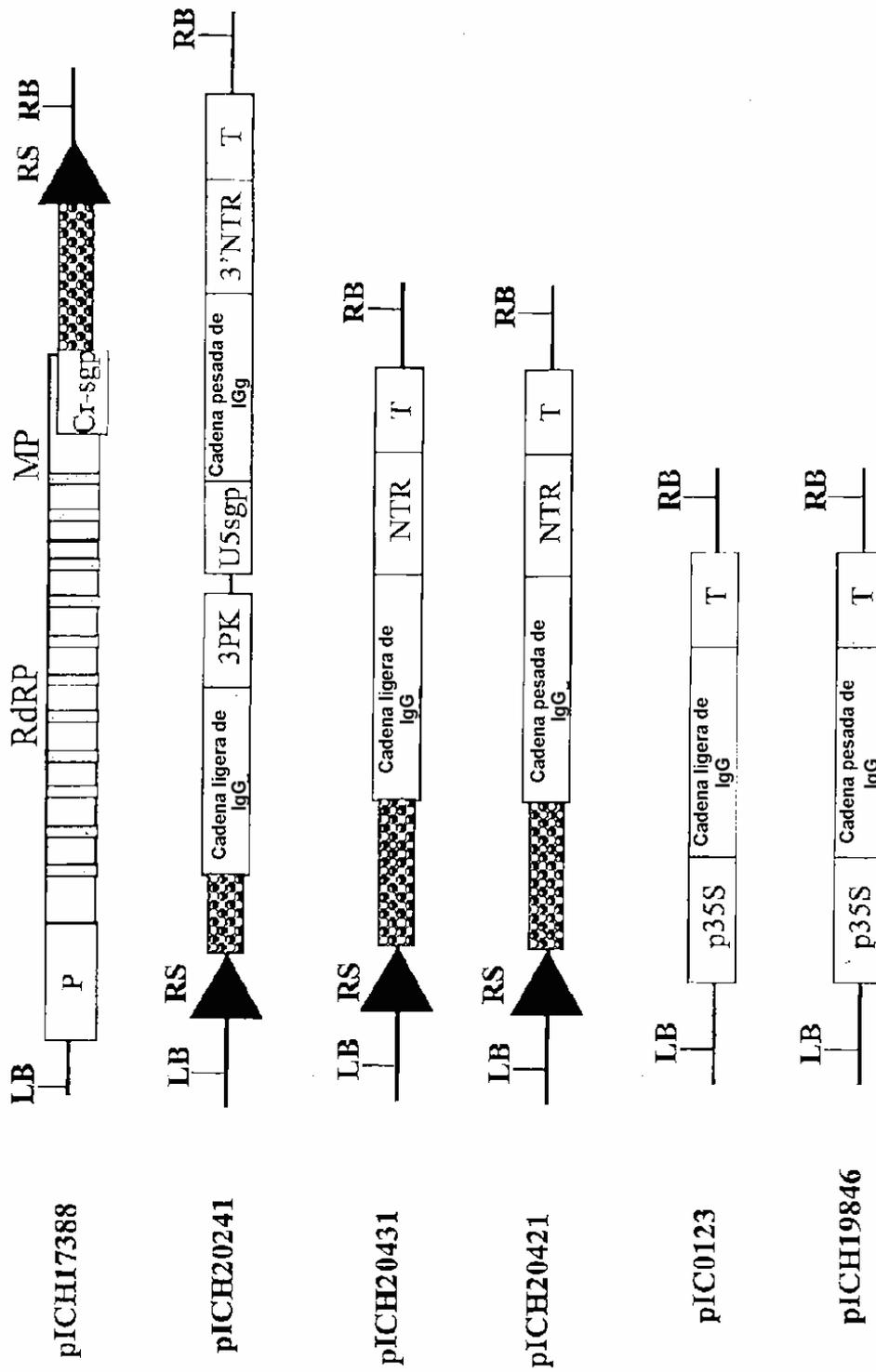


Figura 5

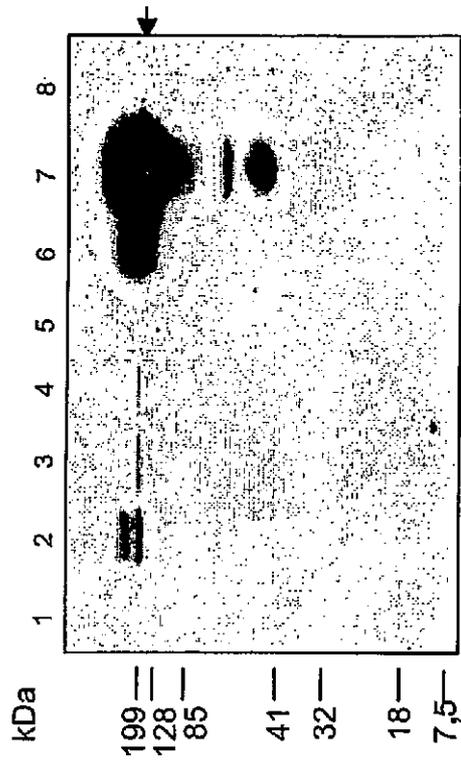


Figura 6

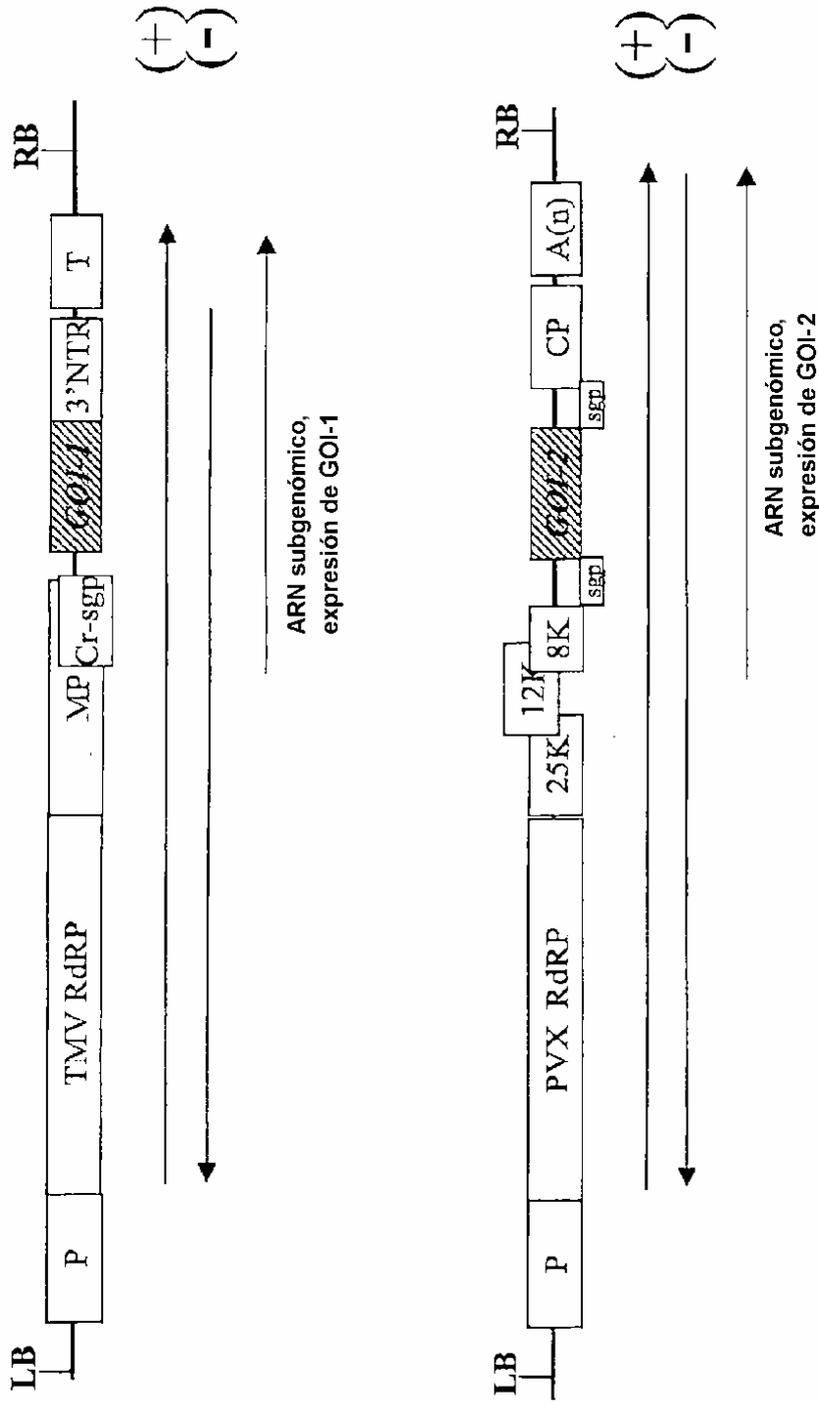


Figura 7

pIC0130

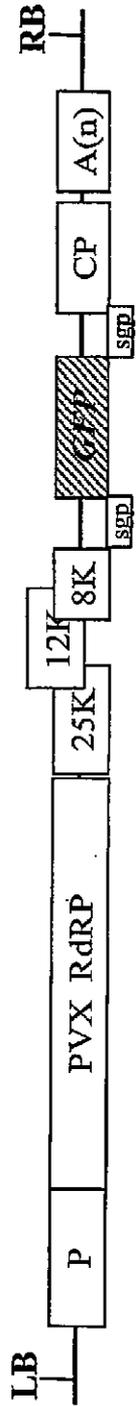


Figura 8

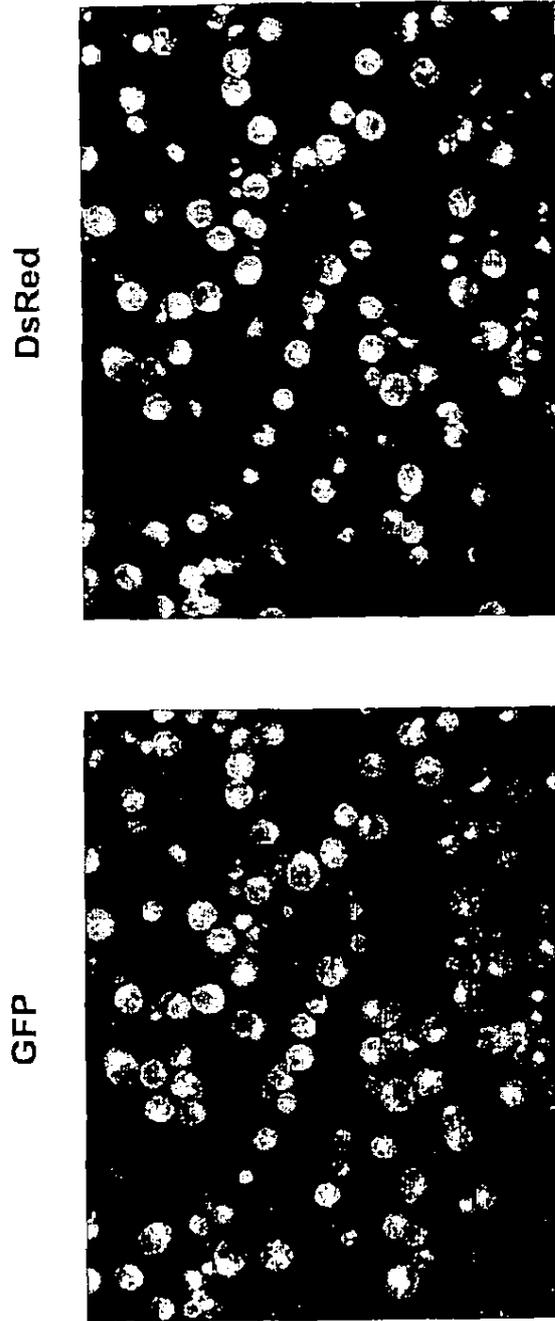


Figura 9

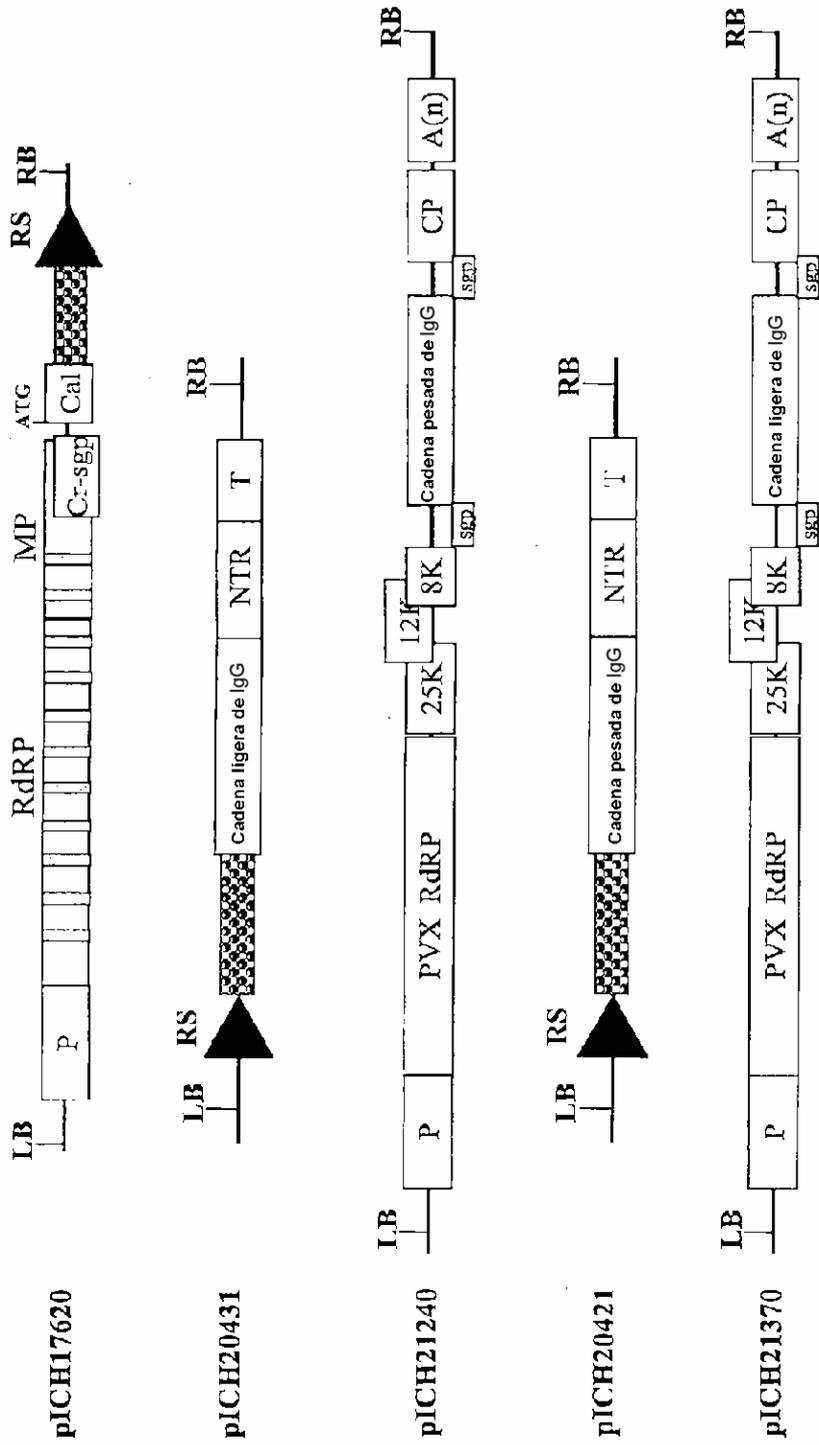


Figura 10A

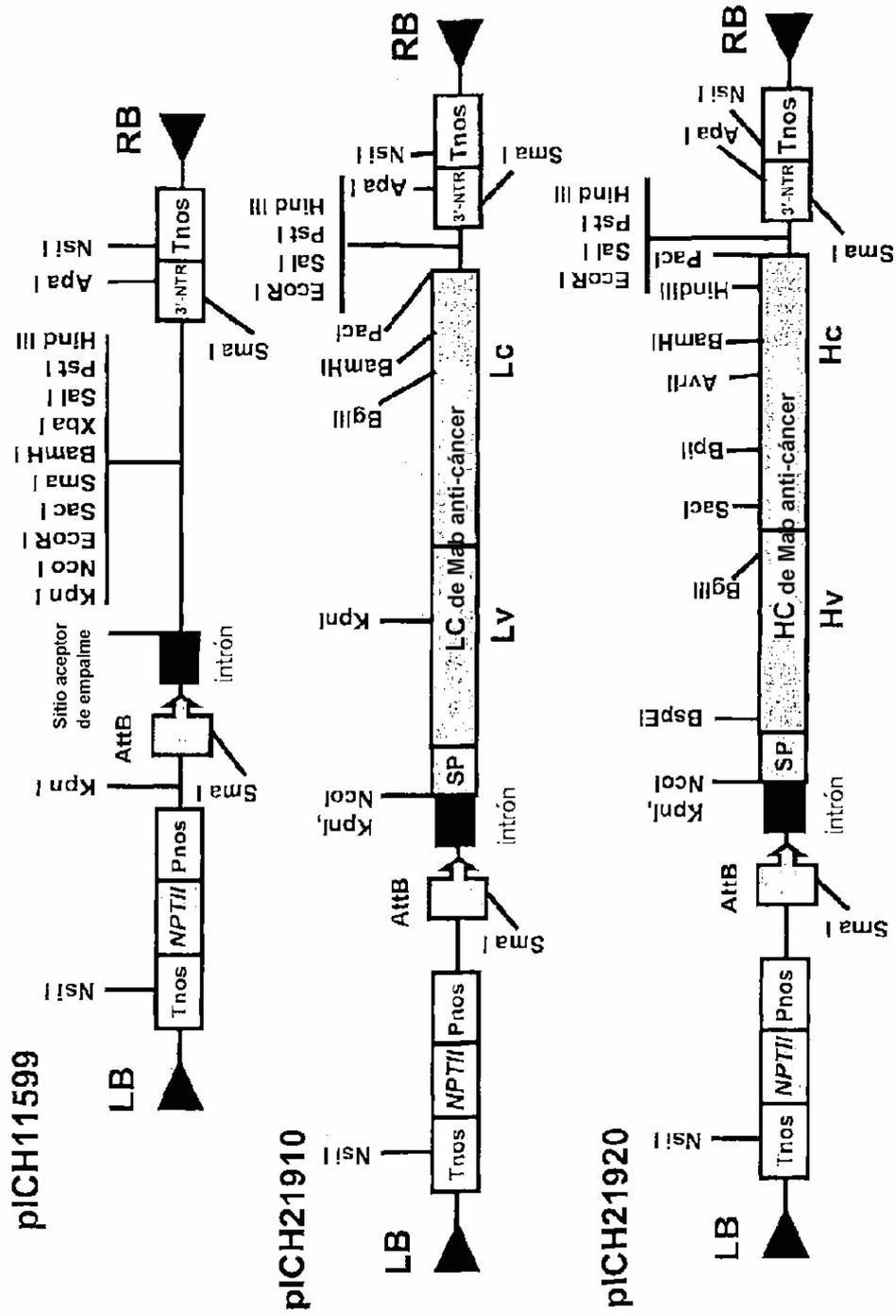


Figura 10B

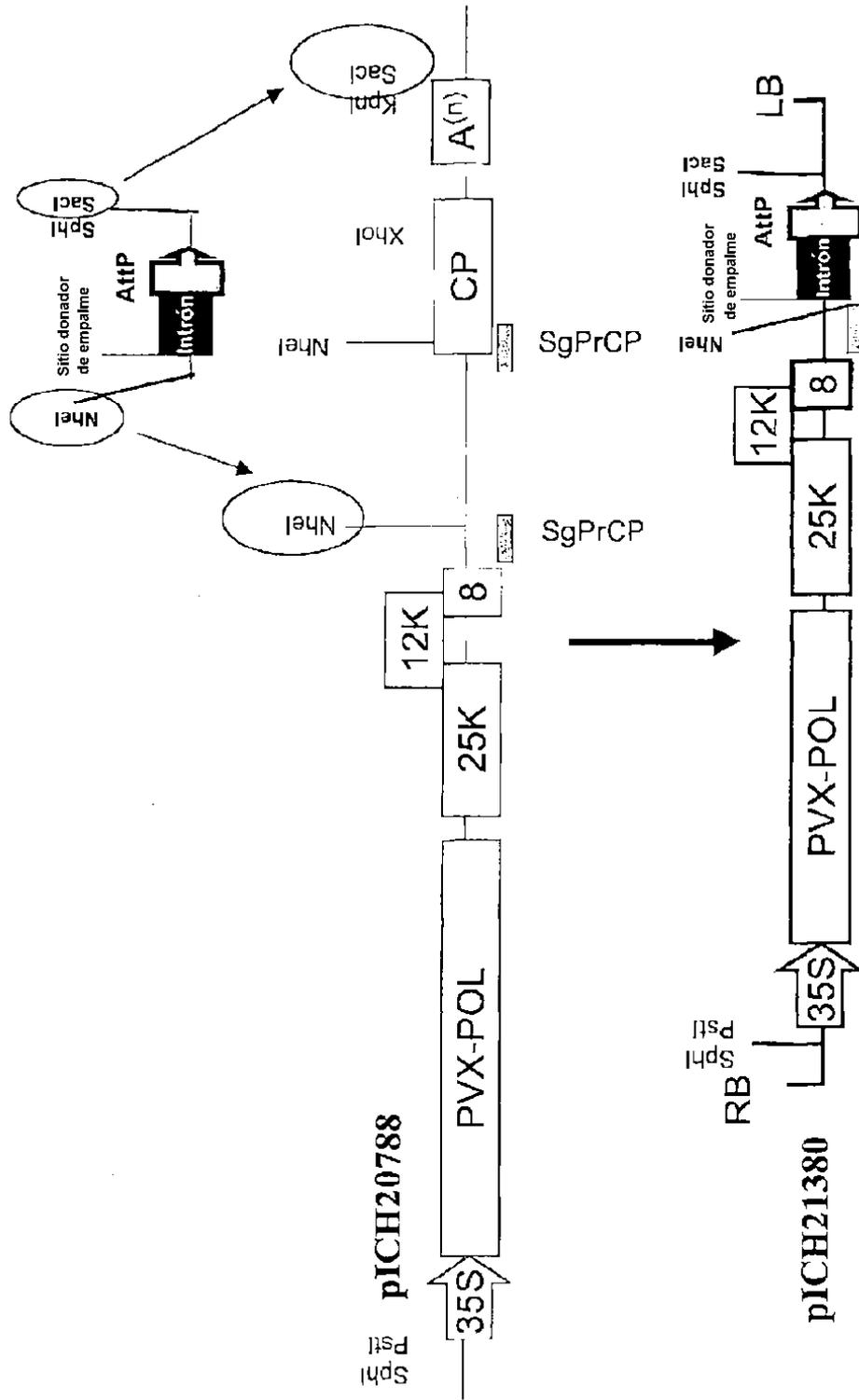


Figura 10D

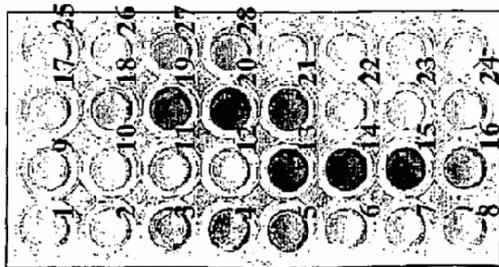
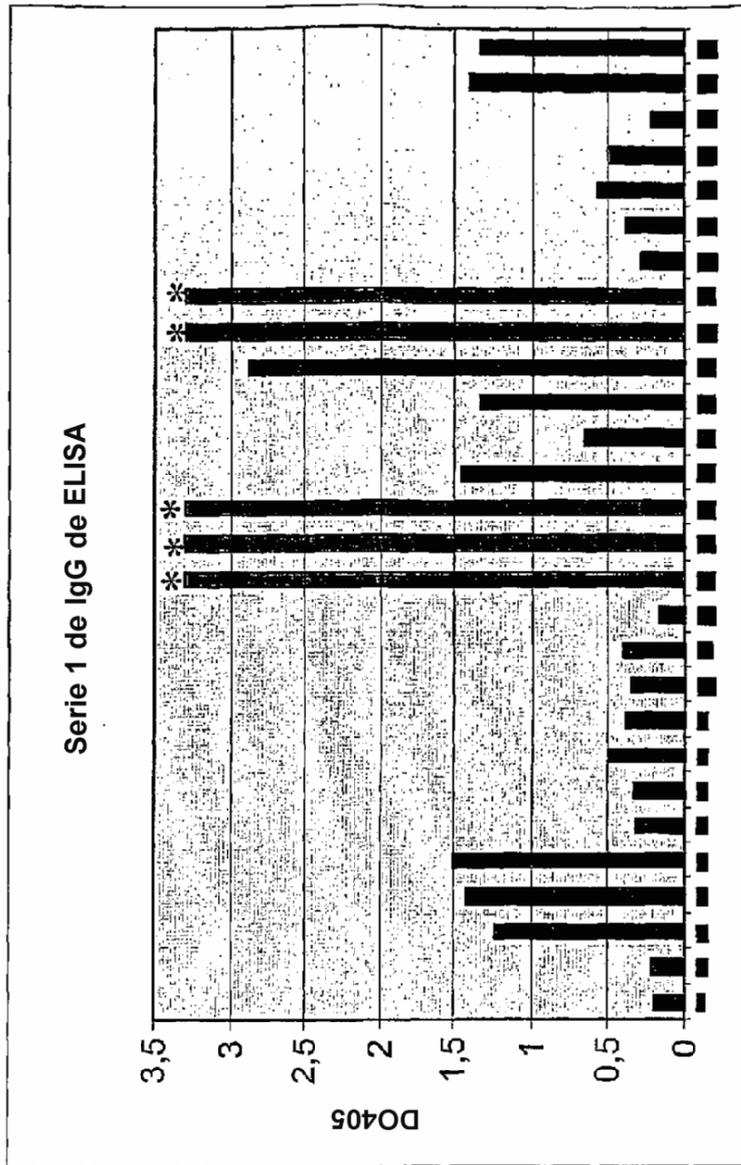


Figura 11A

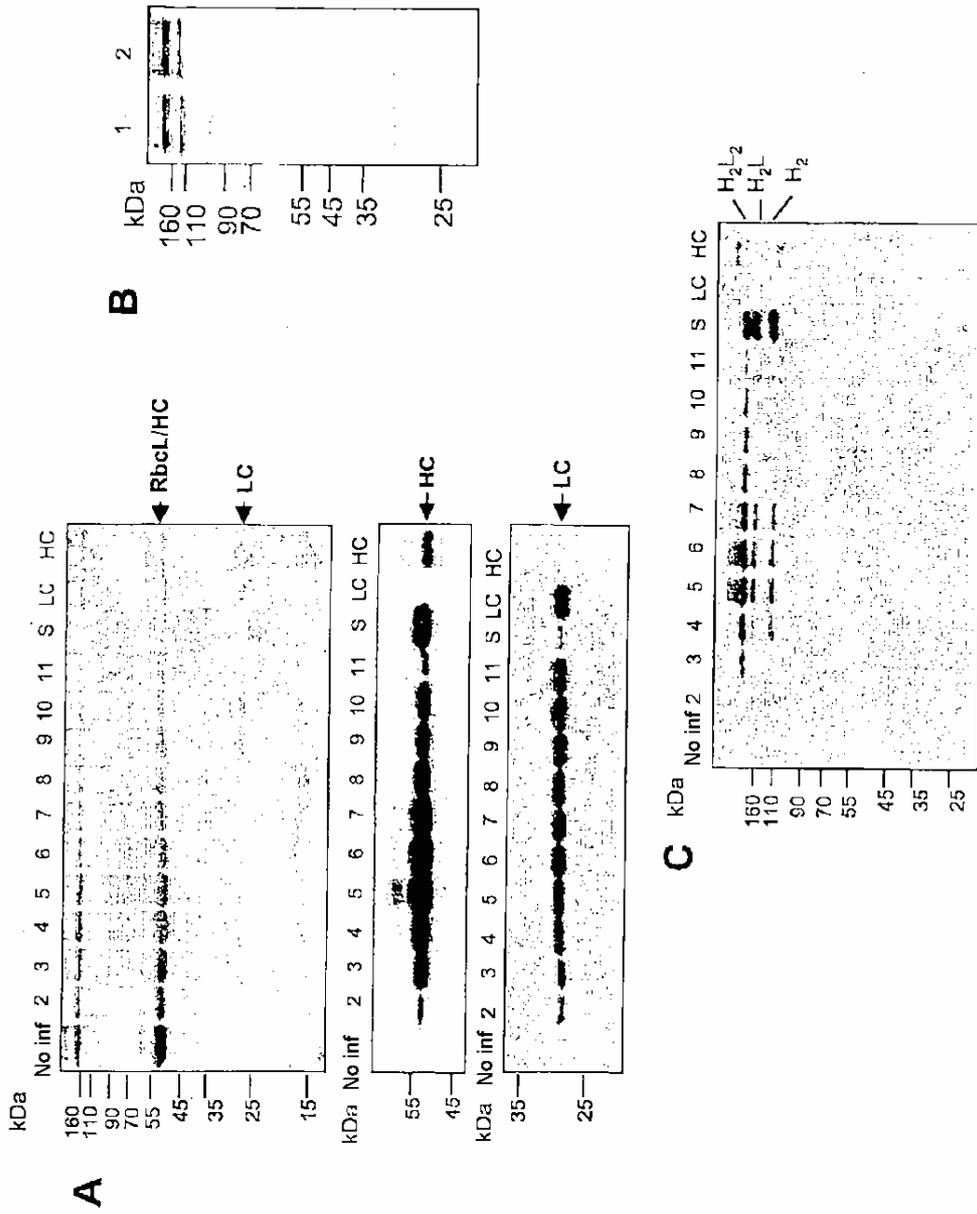


Figura 11B

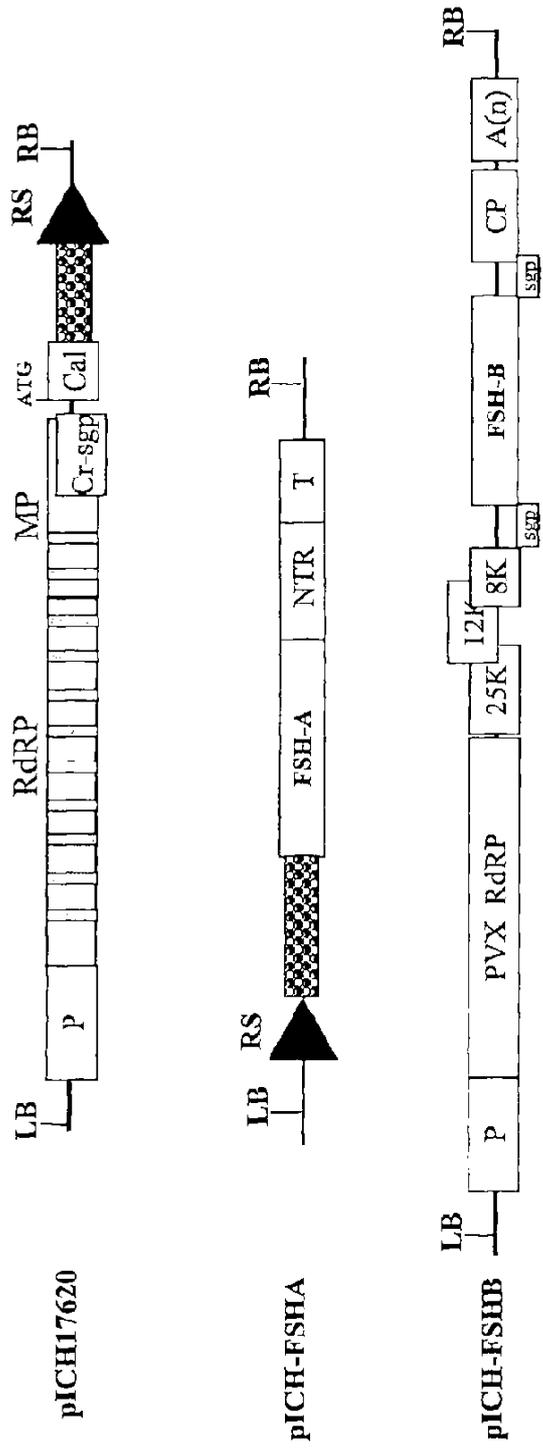


Figura 12

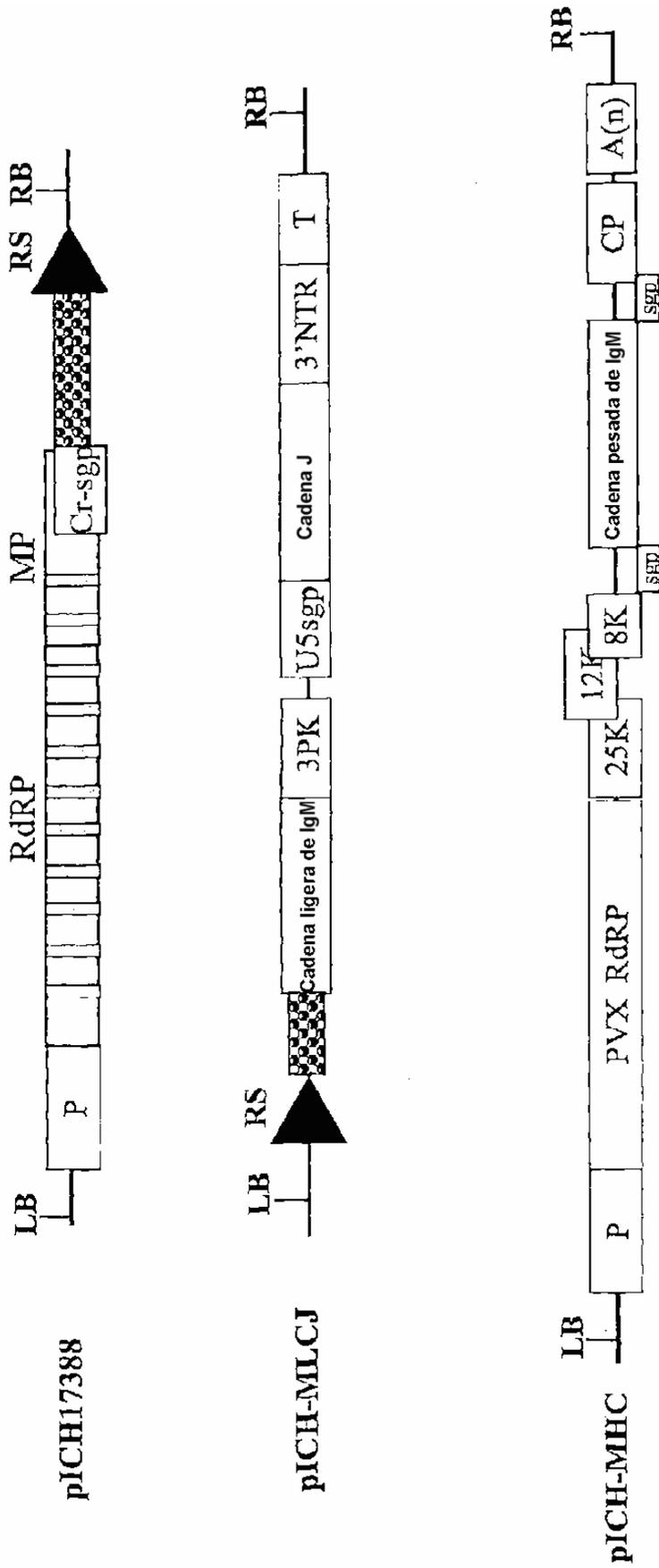


Figura 13