

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 262**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 11/12** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A01H 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013 PCT/EP2013/000296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13703728 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2809786**

54 Título: **Método para la generación y cultivo de un bloque de células vegetales**

30 Prioridad:

**31.01.2012 EP 12000618**  
**31.01.2012 US 201261592780 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.0%)  
Hansastraße 27 c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**RADEMACHER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 644 262 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

Método para la generación y cultivo de un bloque de células vegetales

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología de las plantas. En particular, la presente invención se refiere a la generación y el cultivo de material de células vegetales en forma de un bloque de células multicapa no tejido y su uso para la acumulación o recogida de un producto deseado.

Durante las últimas décadas, se han dedicado enormes esfuerzos al establecimiento y cultivo de sistemas basados en plantas para la acumulación y recogida de proteínas nativas o heterólogas y metabolitos secundarios. La bibliografía proporciona una amplia cantidad de material basado en evidencia que demuestra la utilidad de los sistemas basados en plantas para producir una gran variedad de sustancias deseadas que son o bien secretadas en el medio de cultivo o bien se aíslan de las células, tejidos, orgánulos productores o incluso plantas completas o partes de las mismas. Asimismo, existe una amplia variedad de protocolos de transformación que garantizan el establecimiento de material de planta o bien establemente o bien transitoriamente transformado. Sin embargo, todavía existe la necesidad de una tecnología fiable, relativamente rentable y rápida para obtener altos rendimientos de un producto deseado de células vegetales.

La presente invención se refiere así a la provisión de un sistema basado en plantas para producir altos niveles de productos nativos o recombinantes deseados que hace uso de células de un cultivo de células vegetales en suspensión y vence los problemas del estado de la técnica, en particular con respecto a la necesidad de manipular grandes volúmenes de medio de cultivo durante el cultivo y el posterior procesamiento, que incluye eliminación, extracción y purificación de productos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a la expresión o generación de proteínas nativas o recombinantes y metabolitos y material de células vegetales específico de uso derivado de cultivos en suspensión de células vegetales comúnmente establecidos como hospedador de producción.

Al contrario de muchos sistemas actualmente usados y desarrollados que se basan en el uso de plantas intactas o al menos tejido de planta intacto y diferenciado, el uso de células en suspensión tiene la ventaja de que el material homogéneo puede ser reproduciblemente producido bajo condiciones controladas, asépticas y contenidas.

Actualmente hay dos estrategias principales para expresar proteínas recombinantes en plantas, concretamente (i) la generación de plantas transgénicas estables o líneas celulares en suspensión o (ii) la expresión transitoria de gen(es) heterólogo(s) después de infectar los hospedadores de expresión en la plantas (planta, tejido o células) con una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium*), un virus (por ejemplo, virus del mosaico del tabaco, virus de la patata X/Y, virus del mosaico del frijol y muchos otros), o una combinación de ambos (por ejemplo, magnificación) para permitir que el hospedador exprese la información genética heteróloga (ADN o ARN).

Aunque la invención también comprende el uso de material de células vegetales establemente transformado, sistemas para la expresión transitoria tienen la ventaja de velocidad (gen a producto, tiempo de comercialización, respuesta de emergencia), además de la posibilidad de lograr niveles de acumulación que son muy superiores a aquellos que pueden normalmente obtenerse en plantas transgénicas establemente transformadas o partes de las mismas, tales como células.

Según una realización preferida, así, la presente invención combina las ventajas inherentes a los cultivos en suspensión de plantas con las ventajas de los sistemas de expresión transitorios.

La adición de *Agrobacteria* a cultivo en suspensión de plantas seguido de cultivo adicional de las células vegetales y las bacterias en suspensión ya se ha probado y publicado (véase el documento US 6.740.526 B1), pero los enfoques descritos padecen baja eficiencia de transformación. Además, las *Agrobacterias* crecieron demasiado rápidamente las células vegetales en suspensión, a menos que se tomaran medidas eficaces como el uso de antibióticos para destruir las bacterias o el uso de cepas auxotróficas para suprimir el crecimiento. Otros han descrito efectos perjudiciales directos (muerte celular, respuesta hipersensible) de las bacterias co-cultivadas en las células vegetales en suspensión. Como consecuencia, actualmente no existe un sistema de producción basado en planta que combine la eficiencia de la Agroinfiltración/infección viral transitoria de plantas intactas o tejidos con las ventajas de los cultivos en suspensión de plantas y permita la producción de biomasa homogénea, preferentemente bajo condiciones controladas asépticas que es de tremenda ventaja para establecer una producción conforme a GMP. Como se ha mencionado anteriormente, el enfoque de la co-fermentación como se desveló en el documento US 6.740.526 B1 padece baja eficiencia de transformación y crecimiento en exceso bacteriano concomitante, mientras que los sistemas basados en hojas alcanzan alta eficiencia de transformación pero, sin embargo, encuentran problemas con el aumento de escala, padecen bajos rendimientos espacio-tiempo para la producción de biomasa inicial y se basan en condiciones controladas, pero no asépticas, para la producción de biomasa vegetal. Los altos costes de producción en comparación con los sistemas microbianos son el principal motivo por el que estos sistemas no han ganado interés generalizado y uso como sistemas de producción para productos biológicos. Como consecuencia, la investigación y desarrollo se dirige a aplicaciones más especializadas donde la ventaja combinada de velocidad y robustez de producción son importantes, es decir, respuesta de emergencia (por ejemplo, vacunas contra la gripe, enfermedades nuevas-emergentes, medicina personalizada, etc.). Se desvelan estos problemas,

además de la provisión de medios mejorados para manipular los antecedentes genéticos de cualquier material hospedador de planta.

5 Según la invención, se proporciona un método para la generación de material de células vegetales en forma de un bloque privado de medio, estructurado poroso y de células multicapa no tejido y para el posterior mantenimiento de dicho bloque de células, que comprende las etapas de (i) proporcionar un bloque de células que tiene una estructura porosa separando las células de un cultivo de células vegetales en suspensión, en el que las células separadas de dicho cultivo de células vegetales en suspensión son nativas o transgénicas y capaces de acumular un producto deseado, y en el que el contenido de líquido comprendido por el bloque de células se reduce y ajusta para corresponderse con una densidad del bloque de células entre 0,1 y 0,9 en peso de células húmedas por cm<sup>3</sup>, estableciendo así la naturaleza privada de medio y estructurada porosa de dicho bloque de células, y (ii) incubar dicho bloque de células privado de medio y estructurado poroso en un entorno no líquido bajo una humedad relativa del 50 al 100 % para acumular dicho producto deseado sin poner dicho bloque de células sobre o en cualquier contacto con un medio de mantenimiento o de crecimiento.

15 Como será reconocido por un experto, las células dentro de un tejido normalmente tienen conexiones íntimas, están normalmente diferenciadas y frecuentemente presentan morfologías particulares y células polarizadas. Además, las células dentro de un tejido normalmente tienen orientaciones características las unas con respecto a las otras.

20 A diferencia, los bloques de células según la invención se generan a partir de cultivos de células vegetales en suspensión. Una propiedad particular de los cultivos de células vegetales en suspensión es que las células individuales o agregados de varias células están moviéndose o son móviles las unas con respecto a los otros y no presentan un nivel de organización superior.

25 Como consecuencia, bloques de células según la invención comprenden células individuales y agrupaciones de células que no tienen orientación relativa particular entre sí. Estas células son coladas de tal forma que el conglomerado resultante se empaqueta en una estructura porosa tridimensional que tiene huecos de aire significativos. Hay una clara correlación entre la densidad del bloque de células y la presencia de huecos de aire. Los huecos de aire son importantes por varios motivos. Primero, permiten el eficiente intercambio de gas de forma que cantidades suficientes de oxígeno puedan ser fácilmente suministradas a las células. Segundo, los huecos de aire pueden ser temporalmente y fácilmente inundados otra vez con líquidos (= tratamientos). Tales tratamientos temporales pueden usarse para poner diversos agentes en estrecho contacto con todas las células del bloque de células, proporcionándose así un método eficiente para la transformación genética, biotransformación, recuperación de producto mediante elución o lavado del bloque de células, aplicación de sustratos o analitos para fines de diagnóstico (por ejemplo, inmunoensayos basados en bloques de células). Es importante que estos tratamientos sean solo temporales y que la estructura porosa del bloque de células se reconstituya y la densidad del bloque de células se confirme para garantizar la alta viabilidad durante las posteriores etapas de incubación. Debido a la naturaleza porosa del bloque de células, es además importante en ciertas aplicaciones que la humedad sea suficientemente alta para prevenir que el bloque de células se seque debido al alta área superficial que está en contacto con la fase gaseosa en la interfase célula / hueco de aire.

35 En particular, una realización preferida del método según la invención comprende (i) una primera etapa de cultivo en la que se cultiva una suspensión de células vegetales, preferentemente en condiciones controladas y/o asépticas, para la provisión de una biomasa de planta homogénea, (ii) una etapa de separación en la que los medios líquidos se separan de las células vegetales de tal forma que se genere un bloque de células poroso con una densidad entre 0,1 y 0,9, preferentemente entre 0,2 y 0,85, lo más preferentemente entre 0,4 y 0,8 g en peso de células húmedas por cm<sup>3</sup>, y (iii) una segunda etapa de cultivo en la que el bloque de células se incuba además en un entorno no líquido en condiciones controladas (véase anteriormente) durante al menos otro día. Dependiendo de la situación actual y la intención del médico, esta segunda etapa de cultivo puede realizarse durante varios días.

45 Normalmente, la segunda etapa de cultivo se realiza durante 2 a 7, preferentemente durante 3 a 5 días.

50 En todos los métodos de cultivo del estado de la técnica actual, el material de células vegetales está en contacto directo o indirecto (soporte poroso o mediado por membrana) con un medio que contiene nutriente continuamente, es decir, la mayoría de las veces el contacto con medio continuo solo se interrumpe brevemente (es decir, cortos periodos de tiempo) cuando las células se transfieren de un medio a otro. Las células pueden filtrarse o lavarse para eliminar medio "antiguo", pero entonces se transfieren rápidamente a un medio nuevo.

55 A diferencia del estado de la técnica, esta etapa de cultivo se realiza en condiciones que mantienen la viabilidad de las células y promueve la acumulación de producto con crecimiento y división celular reducida o mínima. Esto se logró cultivando células empaquetadas bien aireadas en un entorno húmedo, preferentemente sin contacto con un medio de crecimiento líquido o gelificado del que difunden componentes o nutrientes en el bloque de células (documentos US2002/092037 A1; WO2005/103271 A1). En el estado de la técnica, se siembran en placa capas de células delgadas o se transfieren sobre membranas de soporte dispuestas sobre medio con el fin de suministrar nutrientes a las células. Sin embargo, el cultivo de capas de células sobre el medio de crecimiento tiene la desventaja de que solo pequeñas cantidades de biomasa pueden ser tratadas debido a la necesidad de contacto con el medio. A diferencia, el método de bloques de células de la invención es independiente de un medio de

soporte, es escalable y así adecuado para aplicaciones industriales. Por consiguiente, la etapa de incubación o de cultivo anterior (ii) se lleva a cabo en un entorno no líquido, preferentemente sin poner el bloque de células privado de medio y estructurado poroso sobre o en cualquier contacto con un medio de mantenimiento o de crecimiento (solidificado en líquido o gel).

5 Según una realización preferida del método según la invención, la segunda etapa de cultivo se realiza durante semanas o meses. En tales casos, las condiciones de cultivo pueden tener que ser modificadas para mantener la viabilidad de las células. Esto puede lograrse, por ejemplo, proporcionando temporalmente (es decir, durante un periodo de tiempo de hasta 3 horas, preferentemente de hasta 1 hora) nutrientes al bloque de células y/o reduciendo la temperatura de incubación.

10 En el estado de la técnica, se usa un cultivo en suspensión para acumular un producto deseado que queda dentro de las células comprendidas por el cultivo o es secretada en el medio de cultivo. Cuando el periodo de producción ha terminado, las células son o bien destruidas con el fin de recoger el producto acumulado o bien desechadas. Se han usado células vegetales en suspensión establemente transformadas, es decir, sumergidas en medios líquidos, para producir un amplio espectro de diferentes proteínas recombinantes terapéuticas (S. Hellwig et al., "Plant cell cultures for the production of recombinant proteins", Nature Biotechnol 22: 1415-1422, 2004).

15 Según la invención, las células comprendidas por el cultivo en suspensión se usan para generar un material de células vegetales no tejido privado de medio en una forma de un bloque de células estructurado poroso definido además por tener una densidad específica como se ha mencionado anteriormente. Este bloque de células que opcionalmente puede proporcionarse en una forma definida por el usuario puede considerarse un conglomerado de células multicapa artificialmente generado o torta de células que consiste en células vegetales no diferenciadas que han sido cultivadas en cultivo líquido. Las células fuente pueden ser células transgénicas establemente y/o transitoriamente transformadas, células mutadas o células no mutadas (nativas) capaces de acumular un producto deseado. Colando la suspensión de células en la estructura de un bloque de células mientras que se elimina la mayoría del medio líquido circundante, se genera un material de células vegetales poroso tridimensional. Aunque se prefiere técnicas de filtrado tales como filtración a vacío, filtración a presión y centrifugación a través de un filtro, el medio líquido también puede eliminarse por otros medios (por ejemplo, separadores usados en la industria alimentaria, centrifugación continua) conocidos en la técnica, en tanto que se garantice la anterior densidad del bloque de células. El establecimiento, mantenimiento y/o restablecimiento de huecos de aire entre las células individuales o agrupaciones de células comprendidas por el bloque de células proporciona una estructura porosa del bloque de células que asegura la buena aireación (intercambio de gases), que es un factor crucial para la viabilidad y la productividad del material de células vegetales empaquetado durante la segunda fase de cultivo. En el contexto de la invención, esta condición de cultivo no comprende cultivar el bloque de células sobre medios solidificados (gelificados) o líquidos, en suspensión o en contacto con cualquier entorno líquido que pueda dificultar la aireación necesaria como se ha mencionado anteriormente. Como dicho cultivo se realiza esencialmente en ausencia de cualquier medio o líquido que rodee cada célula comprendida por dicho bloque de células, tiene que asegurarse una humedad relativa suficiente. Como será apreciado por un experto, hay una correlación rigurosa entre la densidad (en g en peso de células húmedas por cm<sup>3</sup>), el contenido de líquido y la aireación (conferida por la constitución de huecos de aire en cantidad y volumen suficientes) del bloque de células. Sin embargo, como se explicará en más detalle en lo sucesivo, el bloque de células aireado puede tratarse (temporalmente) poniendo en contacto el mismo con un pequeño volumen de vectores de transformación o sustancias que incluyen, pero no se limitan a, nutrientes, sustratos, hormonas, enzimas, metabolitos y precursores. En este contexto, temporalmente significa que estos tratamientos que incluyen la provisión de nutrientes en el transcurso de una incubación a largo plazo (es decir, durante semanas o meses) son solo realizados durante un corto periodo de tiempo (hasta 3 h, preferentemente hasta 1 h), después de que el medio líquido se extraiga otra vez y los huecos de aire de los bloques de células porosos se reconstituyan, produciendo una densidad del bloque de células como se define en el presente documento.

Por consiguiente, el método según la invención comprende opcionalmente cultivar el bloque de células en presencia de un gas, vapor, niebla, polvo y/o aerosol, etc., que comprende o que representa un organismo, una sustancia química y/o biológica, o molécula, respectivamente.

50 Según una realización preferida, las células comprendidas por el cultivo en suspensión de células son células nativas (por ejemplo, no mutadas) o no transgénicas que, antes de realizar la segunda etapa de cultivo, se transforman con al menos un vector de expresión que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que preferentemente está operativamente unida a un promotor funcional, en la que dicha al menos una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un producto deseado que va a acumularse y ser recogido en la etapa (ii) del método según la invención.

60 El término "transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de cualquier ácido nucleico o análogo de ácido nucleico en la célula vegetal. Después de la transformación, el ácido nucleico puede ser establemente integrado en el genoma de la célula hospedadora. Alternativamente, el ácido nucleico administrado puede no integrarse en el genoma y puede ejercer su efecto o bien en el citosol o bien en el núcleo o en cualquier orgánulo celular.

El ácido nucleico puede ser un elemento autónomamente replicante tal como un viroide, un virus o virus deconstruido, o una combinación de elementos necesarios de más de un virus. Alternativamente, el ácido nucleico administrado puede solo ser un componente de un elemento autónomamente replicante tal como un viroide, un virus o virus deconstruido. Los otros componentes pueden proporcionarse/complementarse por la célula hospedadora o por una célula hospedadora transgénica.

El término "heterólogo", como se usa en el presente documento, indica que la secuencia de genes/ nucleótidos en cuestión ha sido introducida en células vegetales usando ingeniería genética. Un gen heterólogo puede aumentar la expresión de una proteína de interés a partir de un gen equivalente endógeno, es decir, uno que normalmente realiza la misma función o una similar, o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. Una posibilidad adicional es poner una secuencia de ácidos nucleicos dentro de una célula diana cultivada en la que ella o un homólogo se encuentra naturalmente, pero en la que la secuencia de ácidos nucleicos está unida y/o es adyacente al ácido nucleico que no se produce naturalmente dentro de la célula, o células de ese tipo o especie o variedad de planta, tal como operativamente unida a una o más secuencias reguladoras, tales como una secuencia promotora, para el control de expresión. Otra posibilidad más es una secuencia de ácidos nucleicos para inducir el silenciamiento de un gen existente por antisentido y/o silenciamiento (siendo el producto deseado el resultado a lograr). Otra posibilidad es un ácido nucleico con función reguladora, tal como un miARN (producto deseado). Otra posibilidad más es un ácido nucleico que es una ribozima o un aptámero (producto deseado).

Se define que "vector" incluye, entre, otros, cualquier plásmido, cósmido, fago o vector viral en forma lineal o circular doble o monocatenaria que puede o puede no ser auto-transmisible o movilizable, y que puede transformar un hospedador procarionta o eucariota y existe extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

"Vector de expresión" se refiere a un vector en el que un ácido nucleico está bajo el control de, y operativamente unido a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula hospedadora tal como una célula microbiana o vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funciona en múltiples hospedadores. En el caso de ADN genómico o subgenómico, éste puede contener su propio promotor u otros elementos reguladores y en el caso de ADNc éste puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la expresión en la célula hospedadora. "Operativamente unido" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, adecuadamente situado y orientado para la transcripción que va a ser iniciada a partir de un promotor.

Un "vector biológico" es cualquier microorganismo o virus capaz de transformar una célula hospedadora vegetal, es decir, capaz de suministrar un ácido nucleico en la célula vegetal. Ejemplos de "vectores biológicos" son microorganismos infecciosos tales como aquellos que pertenecen a *Agrobacterium*, *Radiobacter* y *Rhizobium*, o virus tales como virus del mosaico del tabaco, virus de la patata x y virus del mosaico del frijol. Más específicamente, *A. tumefaciens* es un "vector biológico".

Para la transformación de las células, una suspensión de un vector biológico o una mezcla de diferentes vectores biológicos que contienen la información genética se aplica al bloque de células generadas como se explica resumidamente anteriormente. El vector infecta las células vegetales y transmite la información genética. Debido a la estructura esponjosa del material de células vegetales en forma de un bloque de células, el vector puede acceder a las células diana individuales precisamente por fuerzas capilares sin tratamientos especiales como inyección o infiltración a vacío que se necesitan para llegar a las células en hojas o plantas intactas que son necesarias. Por tanto, la naturaleza suelta y porosa del bloque de células produce un gran área superficial accesible al vector y así permite altas eficiencias de transformación. Esto es diferente al material de callo y tejidos vegetales diferenciados donde las células tienen contactos célula a célula mucho más apretados que producen acceso limitado del vector a la superficie celular y así en eficiencias de transformación más bajas y acumulación de producto. Normalmente, más del 50 % de las células dentro de un bloque de células se transforman, que es sustancialmente superior a en el estado de la técnica. Aunque se informaron datos no detallados sobre las eficiencias de transformación en la patente de EE.UU. N.º 6.740.526 B1, se ha encontrado que el método como se desveló en su interior es inferior a los métodos de bloques de células según la invención (véanse, por ejemplo, Ejemplo 1, fig. 6C, 6D). Este hallazgo está adicionalmente soportado por la observación de que podrían lograrse rendimientos de anticuerpo de 10 a 100 veces más altos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). La suspensión de vector puede aplicarse fácilmente, por ejemplo por simple goteo o pulverización. Sin embargo, bloques de células grandes y/o gruesos y ciertas formas definidas por el usuario pueden requerir la aplicación asistida por vacío o presión y la eliminación de la suspensión de vector biológico con el fin de lograr la densidad de bloques de células deseada como se define en el presente documento. A diferencia de la infiltración asistida por vacío de tejido de hoja, el método descrito tiene la ventaja de que el exceso de suspensión de vector biológico puede eliminarse y reutilizarse y que la naturaleza porosa del bloque de células puede ser restablecida inmediatamente. La viabilidad de hojas infiltradas depende drásticamente de la captación y/o eliminación del exceso líquido para restaurar la fase gaseosa en el espacio intercelular. Como esto es difícil de controlar, la infiltración asistida por vacío de tejido de hoja sufre variabilidad y tasa de fallos más altas. La realización preferida es aplicar la suspensión de vector al bloque de células, ya que esto tiene varias ventajas prácticas con respecto a la manipulación, automatización, contención, aumento de escala y producción y eliminación de residuos. Alternativamente, la suspensión de las células vegetales puede mezclarse con la suspensión de vector antes de formar el bloque de células. La restauración de los huecos de aire y el cultivo privado de medio de un bloque de

células infiltrado con un vector biológico como *Agrobacterium* garantiza que el vector microbiano no destruya las células vegetales que crecen en exceso.

5 En lugar de una suspensión de vector biológico puede usarse una disolución que contiene ácidos nucleicos o análogos de ácido nucleico, o una suspensión de partículas o una emulsión recubierta con o que contiene ácidos nucleicos.

10 Después de la aplicación del vector biológico, el bloque de células se incuba o cultiva durante un cierto tiempo en condiciones controladas para permitir que el bloque de células vegetales restablezca su estructura porosa restaurando los huecos de aire entre las células individuales o agrupaciones de células y para permitir que las células vegetales expresen las proteínas recombinantes y así acumulen el (los) producto(s) deseado(s). Las condiciones de incubación (por ejemplo, tiempo, temperatura, humedad, intensidad de la luz) pueden ser fácilmente ajustadas para favorecer la síntesis de un producto deseado específico. No se necesita equipo especial para soportar el bloque de células, bandejas de plástico desechables de bajo precio son suficientes para su mantenimiento. Durante un primer periodo de cultivo, los huecos de aire se reconstituyen debido a la evaporación y absorción del líquido aplicado con el vector biológico. Alternativamente, los huecos de aire pueden reconstituirse eliminando el exceso de líquido por métodos asistidos por vacío o presión. Después de completarse el cultivo, los bloques de células se recogen y el producto se separa/aísla de la biomasa aplicando procedimientos de purificación apropiados conocidos en la técnica. En casos en los que se indica que un resultado analítico o de diagnóstico es el producto deseado, la recogida también puede tener lugar durante el periodo de incubación/cultivo. El proceso completo puede ser automatizado y puede ser fácilmente aumentado o reducido de escala. Debido a la fácil configuración y la falta de metodología compleja, es factible diseñar este proceso altamente controlado para cumplir los requisitos de GMP y/o aplicaciones de alto rendimiento y/o producción industrial a gran escala.

15 El método puede ser especialmente apto para productos que son tóxicos para los seres humanos, animales y/o el entorno, debido a que el proceso entero puede realizarse bajo contención completa, proporcionando, por tanto, alta bioseguridad. Esto se aplica también para compuestos, vectores y/o ácidos nucleicos usados en el proceso de producción.

20 El término "recogido", como se usa en el presente documento, debe entenderse que comprende cualquier acción que se basa en la expresión y acumulación del producto deseado. Además de la recogida que comprende la separación/aislamiento del producto deseado como se ha mencionado anteriormente, la recogida en general también está relacionada con asegurar cualquier resultado de diagnóstico o analítico que se basa en el producto deseado nativamente o recombinantemente acumulado. Es evidente para un experto que en estos casos la separación/aislamiento del propio producto deseado puede ser omitida.

25 Alternativamente, el bloque de células también puede generarse a partir de un cultivo en suspensión que comprende células transgénicas con el fin de aumentar la producción de un producto deseado (por ejemplo, proteína recombinante, metabolito), por ejemplo, proporcionando un componente de un sistema replicativo o una vía metabólica o regulando por disminución ciertos factores hospedadores.

30 También se desvela material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido que tiene una densidad entre 0,1 y 0,9 g, preferentemente entre 0,2 y 0,85, lo más preferentemente entre 0,4 y 0,8 g en peso de células húmedas por  $\text{cm}^3$ , obtenido u obtenible por un método según la invención como se desvela en el presente documento. En otras palabras, la presente divulgación proporciona material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido que tiene una densidad entre 0,1 y 0,9, preferentemente entre 0,2 y 0,85, lo más preferentemente entre 0,4 y 0,8 g en peso de células húmedas por  $\text{cm}^3$ .

35 El bloque de células también puede tratarse con o cultivarse en presencia de precursores, inductores, hormonas, estabilizadores (por ejemplo, solutos compatibles), inhibidores, moléculas de iARN/ARNip, compuestos de señalización, enzimas (por ejemplo, pectinasa) y/o desencadenantes, además de o en lugar de la suspensión de vector, para la producción de proteínas o metabolitos recombinantes y/o endógenos (nativos).

40 En una divulgación particular, las sustancias aplicadas inducen la diferenciación de las células no diferenciadas comprendidas en el bloque de células. Esto puede lograrse, por ejemplo, por la aplicación de hormonas o combinación definida de hormonas, o por la transformación de las células con genes para factores de transcripción.

45 El bloque de células puede tratarse repetidamente usando cualquier serie y/o combinación de suspensiones de vector, soluciones de ácido nucleico o las sustancias mencionadas previamente. Esto significa que el método de la presente divulgación puede ser esencialmente reiterado en tanto que la naturaleza porosa del bloque de células se mantenga y los huecos de aire sean restaurados después de cada tratamiento. En particular, esto también incluye el uso de una mezcla de diferentes suspensiones de vector para co-transformar simultáneamente las células del bloque de células con diferentes ácidos nucleicos.

50 El bloque de células también puede comprender más de una especie diferente de células y/o diferentes clones y/o diferentes líneas celulares transgénicas y/o no transgénicas. Además, un bloque de células heterogéneo también

puede comprender células de diferentes especies o incluso reinos, esencialmente usando las células vegetales como soporte poroso para co-cultivar las otras células, por ejemplo levadura, hongos, células animales y humanas.

5 En otro aspecto, el bloque de células poroso se usa como un soporte altamente reproducible y homogéneo para ensayos de evaluación del crecimiento y/o la vitalidad de organismos co-cultivados, en el que dicha evaluación se indica para representar el producto deseado. Preferentemente, el bloque de células se usa para probar y/o cribar moléculas (metabolitos, péptidos y/o proteínas) que se producen por el bloque de células para su actividad contra el organismo co-cultivado. Tales ensayos generalmente comprenden las siguientes etapas, (1) se genera un bloque de células poroso según la invención, (2) se añade un compuesto, vector y/o ácido nucleico a dicho bloque de células y opcionalmente dicho bloque de células se incuba durante un periodo adecuado, (3) se inocula un área seleccionada de dicho bloque de células poroso con un segundo organismo, (4) se incuba el bloque de células poroso inoculado en condiciones que permiten que crezca el segundo organismo y (5) los efectos (productos deseados) de productos sintetizados en el bloque de células sobre el segundo organismo, como, por ejemplo, sobre el crecimiento y/o la vitalidad, se evalúa después de un tiempo de incubación adecuado. La segunda etapa puede ser omitida, por ejemplo, si se usa una línea celular transgénica en suspensión.

15 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona el uso de material de células vegetales obtenido u obtenible por un método como se desvela en el presente documento y/o que tiene una densidad como se ha definido anteriormente para fines analíticos o de diagnóstico. Por ejemplo, las células comprendidas por el bloque de células pueden incubarse en presencia de un organismo o de una sustancia que va a analizarse o diagnosticarse. Por lo tanto, la divulgación también proporciona una herramienta de diagnóstico o analítica que comprende material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido como se desvela en el presente documento.

20 Por consiguiente, aquellos expertos en la materia apreciarán fácilmente que los bloques de células según la divulgación también pueden usarse para detectar analitos en una muestra que se pone en contacto con el bloque de células ("tratamiento"). Otra vez, el tratamiento del bloque de células con la muestra que contiene el analito de interés solo se realiza temporalmente, es decir, dentro de un corto periodo de tiempo (hasta 3 horas). Después del tratamiento, los huecos de aire tienen que reconstituirse otra vez, es decir, la densidad y porosidad correspondientes del bloque de células tienen que restablecerse. El bloque de células se incuba entonces en ausencia de un contacto continuo con cualquier líquido o medio gelificado/solidificado (suministro de nutrientes). El analito que está presente en la muestra puede inducir la transducción de señales, expresión génica o cualquier otro evento que conduzca a un cambio medible del bloque de células o manipulación de las células comprendidas por él. Cambios o manipulaciones medibles incluyen, pero no se limitan a, proteínas informadas fluorescentes, moléculas indicadoras fluorescentes, enzimas, cambios que conducen a muerte celular, generación de auto-fluorescencia, cambios fisiológicos o morfológicos que pueden ser revelados analizando el bloque de células o incubando el bloque de células con reactivos adicionales que producen una señal detectable directamente en el bloque de células o en eluatos, extractos u otras muestras derivadas del bloque de células. Debe entenderse que pueden usarse tanto células vegetales no mutadas como genéticamente manipuladas, que incluyen células transgénicas estables y células transitoriamente transformadas. En particular, las últimas pueden derivarse por un tratamiento de transformación previo de un bloque de células generado a partir de células no mutadas.

25 El bloque de células según la presente divulgación es altamente susceptible a diferentes tipos de manipulaciones. A diferencia de las células o protoplastos en suspensiones, la densidad de las células en el bloque de células es más alta. Por consiguiente, los compuestos (por ejemplo, desencadenantes para la producción de metabolitos) pueden aplicarse más económicamente, ya que se necesitan cantidades más bajas para obtener la misma concentración eficaz. Además, la aplicación de sustancias altamente concentradas es posible, que es extremadamente útil para bioconversión/biotransformación. Una ventaja en comparación con las plantas intactas, tejido vegetal y/o callo es el área superficial de células accesibles más alta, que es debido a la estructura porosa y esponjosa del bloque de células y sus contactos de células sueltas. En comparación con tanto los cultivos en suspensión como los tejidos vegetales intactos, las sustancias pueden ser más fácilmente y eficientemente aplicadas a y también eliminadas del bloque de células. Por ejemplo, pueden aplicarse precursores o compuestos tóxicos durante solo un corto periodo y pueden realizarse experimentos de radiomarcado y seguimiento. Los inductores pueden aplicarse de una manera más controlada y oportunamente definida, permitiendo el refinado adicional de la expresión génica opcional y otras condiciones de acumulación de producto. Pueden aplicarse secuencialmente una serie de precursores y sustratos para lograr la conversión completa y para elucidar vías metabólicas. Además, pueden recogerse productos secretados acumulados lavando simplemente el bloque de células con una solución de tampón adecuada. De forma interesante, esto permite la eliminación repetida ("ordeño") de productos para evitar la degradación de productos y/o la inhibición de la retroalimentación. Esta estrategia también puede utilizarse para evitar y/o reducir efectos perjudiciales sobre las células hospedadoras, maximizando así la productividad.

30 La provisión de sustancias volátiles, que incluyen nutrientes (por ejemplo, amoníaco, ácidos carboxílicos, dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, fosfinas y aminos orgánicas) al bloque de células también tiene varias ventajas con respecto a los sistemas actualmente establecidos. La administración de tales sustancias en forma gaseosa es difícil de lograr para los cultivos celulares en suspensión. El gas necesita primero ser disuelto en la disolución, un proceso que está limitado por la solubilidad y el transporte. Si se usan plantas intactas y tejidos vegetales, otra vez el transporte es un problema, pero, lo que es aún más importante, necesitan usarse y controlarse volúmenes de

incubación mucho más grandes. Aunque esto ha sido hecho para fines de investigación a escalas pequeñas, aplicaciones industriales a gran escala son generalmente demasiado caras. Además, si el propio producto es un compuesto volátil, el control de la presión de aire puede usarse para acumular y/o recoger el producto. Aquí, cuanto más alta sea la densidad celular (es decir, células por volumen) en comparación con los cultivos celulares en suspensión y la posibilidad de sus formas y geometrías de uso definido ofrece posibilidades únicas, por ejemplo cultivo a baja presión, para ingeniería de procesos que no son posibles con ninguno de los sistemas de producción actualmente existentes. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un medio económico y escalable para estos tipos de aplicaciones.

Alternativamente, los compuestos disueltos pueden administrarse al bloque de células poroso en forma de un aerosol y/o niebla y/o vapor. Este modo de administración no es posible para células en suspensión. Se usa para plantas intactas, sin embargo, la mayoría del compuesto aplicado no llega a su diana, requiriendo dosis más altas, volúmenes y número de tratamientos. La captación de los compuestos a través de la cutícula está muy limitada, requiriendo la administración a través de los estomas. Por consiguiente, tales aplicaciones están limitadas a compuestos altamente eficaces. Aquí, la presente divulgación ofrece una forma de administrar eficientemente casi cualquier compuesto en cantidades significativas al bloque de células. El aumento de escala puede implementarse fácilmente por paralelización, es decir, generando simplemente el número requerido de bloques de células. Alternativamente, el aumento de escala también puede hacerse usando bloques de células grandes adecuadamente dimensionados u hojas, columnas o estructuras 3D similares.

El tamaño vertical de un bloque de células está solo limitado por la fuerza que actúa sobre las células en el fondo del bloque y la compactación resultante de los poros. Este problema, sin embargo, puede ser tratado usando soportes intermedios. Por consiguiente, tamaños verticales típicos de un bloque de células según la divulgación oscilan de algunos mm, es decir, 3 a 5 mm, a varios cm, es decir, 3 a 15 cm, o incluso más. El tamaño horizontal no está limitado. Dimensiones de 10 mm<sup>3</sup> a 10 m<sup>3</sup> son factibles. Tiene que garantizarse aireación/intercambio de gas suficiente, por ejemplo para mantener niveles de oxígeno y dióxido de carbono apropiados. También tiene que controlarse la acumulación de metabolitos primarios y secundarios volátiles, ya que, por ejemplo, altos niveles de etileno pueden ser perjudiciales para las células. Para bloques de células de pequeño espesor (aproximadamente 3-5 cm), el intercambio de gas por difusión es normalmente suficiente. Bloques de células más gruesos pueden requerir aireación activa y/o integración de canales de aire adicionales. A este respecto, la presente divulgación proporciona disoluciones únicas debido a que las células en suspensión pueden ser coladas en prácticamente cualquier forma definida por el usuario.

Según un aspecto de la divulgación, el producto deseado está seleccionado del grupo que consiste en proteínas endógenas (es decir, nativas) y heterólogas o polipéptidos, metabolitos secundarios, marcadores y resultados analíticos/de diagnóstico.

Genes de interés incluyen aquellos que codifican proteínas que ellas mismas son medicamentos naturales, tales como productos farmacéuticos o productos veterinarios.

Los ácidos nucleicos heterólogos pueden codificar, entre otros, genes de origen bacteriano, fúngico, planta, no planta o animal. Proteínas que pueden producirse en un proceso de la invención incluyen heterodímeros, tales como FSH, inmunoglobulinas, anticuerpos de fusión, anticuerpos monocatenarios y otros formatos o derivados de anticuerpo.

Tales proteínas incluyen proteína de retinoblastoma, p53, angiostatina y leptina. Asimismo, los métodos de la invención pueden usarse para producir proteínas reguladoras de mamífero. Otras secuencias de interés incluyen proteínas, hormonas, tales como hormona estimulante del folículo, factores de crecimiento, citocinas, albúmina de suero, hemoglobina, colágeno, taumatina, proteínas similares a taumatina, factores de crecimiento epidérmicos tales como VEGF, insulina, inmunoglobulina A monomérica o dimérica o secretora, proteínas de fusión de transferrina o transferrina, y receptores tales como CD16, CD32, CD64, CD89, receptor de Fc neonatal.

Como será apreciado por el experto, la divulgación permite producir una gran variedad de productos deseados tales como proteínas y polipéptidos que incluyen proteínas (recombinantes) de relevancia farmacéutica (tales como, por ejemplo, vacunas, anticuerpos, enzimas terapéuticas, alérgenos e hipoalérgenos, péptidos antimicrobianos, proteínas estructurales tales como elastina y colágeno para su uso como materiales de recubrimiento biocompatibles, partículas similares a virus, cuerpos de proteína, etc.), proteínas (recombinantes) de valor nutritivo (aditivos alimenticios y para piensos), proteínas (recombinantes) para aplicaciones de diagnóstico (tales como, por ejemplo, enzimas, anticuerpos y anticuerpos manipulados, otras enzimas o proteínas de fusión fluorescentes, antígenos que van a usarse como controles positivos, ligandos de unión para matrices de proteína) y proteínas (recombinantes) de relevancia técnica (tales como, por ejemplo, ligandos de unión para sorbentes de afinidad, enzimas de alto valor, biocatalizadores).

Por consiguiente, la divulgación también proporciona así un método para la producción de al menos un producto deseado seleccionado preferentemente del grupo que consiste en proteínas nativas o heterólogas o polipéptidos, metabolitos secundarios, marcadores, y resultados analíticos / de diagnóstico. El método comprende la generación de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido que tiene una densidad entre

0,1 y 0,9, preferentemente entre 0,2 y 0,85, lo más preferentemente entre 0,4 y 0,8 g en peso de células húmedas por cm<sup>3</sup>, de un cultivo de células vegetales en suspensión, la aplicación de una disolución, suspensión y/o un gas al bloque de células adecuado para inducir o alterar la producción del producto deseado, el ajuste de la densidad del bloque de células dentro del intervalo como se indica anteriormente, si fuera necesario, y el cultivo del bloque de células con una humedad relativa del 50 al 100 % para permitir que el bloque de células produzca y acumule el producto deseado. Opcionalmente, el método comprende además recoger o aislar el producto deseado acumulado de las células productoras comprendidas por el bloque de células.

El sistema basado en el bloque de células de la divulgación también es adecuado como plataforma de cribado para la evolución molecular, ingeniería de proteínas, ingeniería metabólica y aplicaciones de biología sintética y, entre otros, permite la optimización de casetes de expresión génica, plásmidos, etc., como se usa o pretende usarse. Además, usando bloques de células como se describe en el presente documento, la invención proporciona un método analítico de evaluación de construcciones de expresión génica y proteínas diana manipuladas en un modo de alto rendimiento, altamente reproducible y automatizable. Según la divulgación y como se mencionó antes, el objetivo de estas aplicaciones es reunir información y resultados que como tales representan productos deseados que son 'recogidos' durante el segundo periodo de cultivo.

Según otro aspecto, la divulgación proporciona la manipulación de modificaciones de proteínas post-traduccionales mediante la expresión transitoria de las enzimas implicadas y así permite, por ejemplo, la modificación del patrón de glucosilación de glucoproteínas. Además, pueden ser inactivadas enzimas endógenas mediante silenciamiento (por ejemplo, glucosiltransferasas, proteasas, ubiquitina ligasas) para afectar la calidad y cantidad de producto.

Además, la divulgación proporciona la producción de metabolitos secundarios como productos deseados mediante la expresión transitoria de las enzimas de vías implicadas y/o sus factores de transcripción. Las vías bioquímicas también pueden manipularse bloqueando las vías de competición y/o el catabolismo mediante silenciamiento de las enzimas correspondientes. Asimismo, el sistema según la invención es muy apto para la producción de metabolitos mejorada a partir de cultivos celulares genéticamente no modificados (nativos) generando y cultivando bloques de células como se describe en el presente documento. Con el tiempo, la divulgación también puede usarse para cultivar un bloque de células generado a partir de una línea celular en suspensión transgénica que aloja un promotor constitutivo y/o un promotor inducible en presencia de un inductor correspondiente.

En términos generales, los ácidos nucleicos heterólogos pueden ser expresados por cualquier proceso apropiado usado en la materia o pueden ser transcritos o expresados del siguiente modo:

(i) expresión transitoria de ADN 'desnudo', por ejemplo, que comprende un promotor operativamente unido a la secuencia heteróloga de interés;

(ii) expresión de un vector de expresión, tal como un vector de replicación. En términos generales, aquellos expertos en la materia son muy capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión génica recombinante transitoria. Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según convenga. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press o *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992;

(iii) expresión de un vector no de integración;

(iv) expresión de un T-ADN suministrado.

Se entenderá que estas categorías no son mutuamente exclusivas, por ejemplo debido a que un vector no de integración también puede ser un vector de expresión, etc.

Métodos para lograr tal expresión se tratan en cualquier parte en el presente documento.

Las construcciones pueden introducirse a número de copias relativamente alto con promotores fuertes, y sin el efecto de moderación inherente que puede producirse cuando se selecciona un transformante estable en el que una construcción se integra en el genoma. Como resultado, los niveles y concentraciones de proteína producida pueden superar con creces aquellos obtenibles por el uso de métodos para la producción de proteínas en sistemas basados en células de planta del estado de la técnica (cultivos en suspensión transgénicos o expresión transitoria en suspensión).

Así, en un aspecto se desvela el uso de una célula vegetal transitoriamente transformada capaz de generar ARNm que codifica una proteína diana generada por la transcripción de una construcción de ácidos nucleicos introducida que incluye la secuencia de nucleótidos diana operativamente unida a un promotor.

El "ácido nucleico introducido" incluirá así la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga como una secuencia de ADN proporcionada en forma de una construcción que es capaz de dar lugar a la producción de proteína extracelular a un

nivel elevado con respecto al nivel de producción de proteínas normalmente asociado a la expresión transgénica estable de dicha secuencia de ADN.

Así, en un aspecto preferido se desvela un método de logro de la expresión de una secuencia de nucleótidos heteróloga en un bloque de células vegetales, método que comprende la etapa de introducir en una célula diana al menos una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga.

En un aspecto se proporciona un método de generación de al menos una proteína heteróloga extracelular, método que comprende las etapas de:

(i) introducir transitoriamente en una célula diana comprendida por el bloque de células un primer ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga,

(ii) causar o permitir la expresión del ácido nucleico, durante un periodo de tiempo, de la proteína heteróloga proporcionando condiciones de cultivo apropiadas, y

(iii) recoger la proteína heteróloga acumulada de células productoras.

El aislamiento puede ser por medios completamente convencionales, y puede o puede no conllevar purificación parcial o completa.

El periodo de tiempo para el cultivo de bloques de células puede ser cualquier periodo hasta o incluso más allá del que el material celular sigue estando viable, o hasta que se sature con producto; en general puede preferirse que sea entre aproximadamente 1 y 10 días, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 6 días.

Naturalmente, aquellos expertos en la materia reconocerán que puede usarse más de un gen en la, o cada, construcción. Pueden introducirse múltiples vectores (que incluyen cada uno una o más secuencias de nucleótidos que codifican la proteína heteróloga de elección) en las células diana como se describe en el presente documento o en cualquier parte. Esto puede ser útil para producir, por ejemplo, múltiples subunidades, por ejemplo, de una enzima o, por ejemplo, múltiples enzimas de una vía bioquímica. Esto también puede ser útil para, por ejemplo, la inactivación simultánea de genes endógenos, por ejemplo mediante silenciamiento génico mediado por ARNip y/o inactivación de enzimas heterólogas para la modificación post-traduccional del producto y/o la expresión de marcadores y/o la producción de múltiples productos de los mismos tipos o de diferentes.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, la expresión transitoria de la secuencia heteróloga cuando se introduce de esta forma puede dar altos niveles de polipéptido diana durante el transcurso del segundo periodo de incubación, que generalmente será varios días, dependiendo de los métodos precisos y materiales empleados. Usando los métodos de la invención como se describen en el presente documento, se logra la acumulación de polipéptidos heterólogos.

Así, la expresión transitoria en las células comprendidas por el bloque de células representa una herramienta útil en muchos contextos para los que puede previamente haber sido considerada inadecuada, por ejemplo, expresión fiable de proteína heteróloga inestable, es decir, transitoriamente expresada o secuencias de polipéptidos que se acumulan dentro de las células productoras.

El método puede ser particularmente preferido en aquellas aplicaciones donde se requieren altos niveles de expresión, pero donde no son deseables construcciones virales (con el requisito para la 'infección' de plantas) o plantas transgénicas estables son no deseables, por ejemplo, donde un ensayo rápido es importante, o donde la secuencia en cuestión confiere un fenotipo letal o no deseable.

El indicador puede ser cualquier proteína detectable, tal como un gen marcador, comúnmente usado en la materia tal como GUS, proteínas fluorescentes tales como GFP o DsRed, luciferasa, etc. Preferentemente, el indicador es un marcador no invasivo tal como DsRed o luciferasa. Según un aspecto adicional de la divulgación, el material de células vegetales en forma de un bloque de células multicapa no tejido privado de medio obtenido u obtenible según el método como se describe en el presente documento se usa para fines analíticos. Por ejemplo, las células comprendidas por el bloque de células pueden incubarse en presencia de una sustancia que va a analizarse. Por ejemplo, un bloque de células generado forma una línea celular en suspensión transgénica que contiene un gen marcador cribable (GFP, DsRed, luciferasa, GUS, fosfatasa alcalina secretada, o una enzima que es capaz de producir un compuesto detectable intracelularmente) operativamente unido a un promotor inducible puede usarse para detectar el inductor en muestras de prueba. Alternativamente, la construcción de expresión de gen indicador inducible también puede transformarse en un bloque de células generado a partir de una línea celular en suspensión no mutada (no transgénica) en una primera etapa y las muestras de prueba se analizan entonces en una segunda etapa. Preferible, se lleva a cabo un tiempo de incubación de 1-5 días entre las dos etapas. Entonces, se aplica un volumen adecuado de una muestra de prueba líquida o un extracto líquido de una muestra de prueba no líquida a la célula bloqueada. Es importante garantizar en esa etapa que la estructura porosa del bloque de células se mantenga por o bien usando una relación apropiada de volumen de la muestra de prueba y el peso del bloque de células o bien eliminando el exceso de líquido de la muestra de prueba después de un tiempo de contacto adecuado. Tiempos de contacto adecuados son 1 min a 2 h, preferentemente 5 min a 1 h, más preferible 10 a 30 min. Volúmenes

adecuados de las muestras de prueba líquidas son hasta 0,75 ml por gramo del bloque de células, preferible 0,5 ml por gramo del bloque de células, más preferentemente 0,4 ml por gramo del bloque de células.

Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, promotor inducible por estrógenos, etanol, azúcar. Aquellos expertos en la materia también entienden que los circuitos genéticos que usan represores y depresión pueden usarse igualmente. Por ejemplo, la unión de tetraciclina al represor tet conduce a la des-represión del promotor de tetraciclina.

5

Según un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos que son muy útiles para estudiar y optimizar eventos de recombinación debido a la facilidad de manipulación, alta eficiencia de transformación y las numerosas posibilidades de administrar ácidos nucleicos y/o compuestos en las células del bloque de células.

10 Como será apreciado por el experto, el bloque de células según la presente divulgación es superior con respecto a los sistemas transitorios basados en hojas, sistemas transitorios en cultivo líquido, cultivo en suspensión no mutante y/o transgénico estable, y el uso de plantas completas no mutantes y/o transgénicas o partes de las mismas.

A diferencia de la invención, los sistemas de expresión transitorios basados en hojas emplean tejido vegetal diferenciado que consiste en diferentes tipos de células (heterogéneas), mientras que las células en suspensión son conocidas por estar desdiferenciadas o no diferenciadas. En comparación con los sistemas basados en hojas, la invención proporciona las siguientes ventajas:

15

- No se necesitan instalaciones de crecimiento que requieren espacio para la producción de biomasa;
- Independiente de condiciones climáticas externas;
- No hay riesgo de infestación de patógenos vegetales;

20

- Rápido suministro de grandes cantidades de biomasa altamente homogénea – esto es de particular importancia para productos farmacéuticos (disminuye los problemas reglamentarios);

- La recogida de la biomasa es mucho más fácil (no se necesita equipo de recogida especial);

- La preservación por congelación y/o secado es más fácil debido a una relación volumen-biomasa más baja;

25

- Procesamiento más fácil de la biomasa y purificación más fácil del producto (menos lignina, menos fibras, menos proteínas hospedadoras, menos pigmentos);

- La biomasa se produce en condiciones asépticas altamente controladas (disminuye las cuestiones reguladoras);

30

- Ventaja de velocidad en comparación con plantas enteras, fácil aumento de escala de la biomasa (a 0,1 l de cultivo iniciador se puede aumentar la escala en 15 días para proporcionar 100 kg de biomasa en un cultivo en suspensión de 1000 l; 5 d 2,5 l -> 5 d 50 l -> 5 d 1000 l);

- Mejor utilización del rendimiento espacio-tiempo / espacio (biomasa por m<sup>2</sup>; la producción e incubación normalmente no requiere iluminación, que permite un apilamiento denso de los bloques de células);

- Se requieren volúmenes más bajos de suspensiones de vector biológico para infectar la misma cantidad de biomasa (menos "residuo" en comparación con infiltraciones de tanques);

35

- Implementación de una contención completa más fácil que con métodos basados en hojas y plantas;

- La aplicación de bacterias o virus es más fácil con el método de "bloques de células";

- El silenciamiento post-transcripcional involuntario desencadenado en una célula individual está confinado a las pocas células vecinas conectadas por plasmodesmos y no se disemina por vía sistémica;

40

- Pueden aplicarse más fácilmente y más económicamente compuestos químicos adicionales (por ejemplo, desencadenantes, inductores, hormonas o precursores para la producción de metabolito);

- Posibilidad de eluir solo proteínas secretadas de las células en bloques (menos proteínas hospedadoras, acceso a solo proteínas secretadas completamente procesadas);

- Debido a la contención también pueden producirse productos peligrosos (alto nivel de bioseguridad);

- Posible cribado de alto rendimiento (placas filtrantes multipocillo);

- Pueden realizarse tamaños y formas definidas por el usuario más flexibles;
- Más susceptible a automatización;
- Puede usarse material de células vegetales altamente homogéneo para ensayos de crecimiento normalizados de patógenos vegetales u otros organismos, que permite enfoques de cribado de alto rendimiento y de diseño de experimentos;
- La posibilidad de combinar fácilmente diferentes métodos, tecnologías y etapas de manipulación en un único formato, simultáneamente y/o secuencialmente.

Las ventajas en comparación con los sistemas transitorios en cultivo líquido pueden resumirse del siguiente modo:

- Elevada expresión de los transgenes transitoriamente suministrados en comparación con cultivos en suspensión en biorreactores (matraces con agitación o fermentadores) o para callos crecidos sobre medios sólidos;
- No necesita controlar o suprimir el crecimiento bacteriano para evitar el crecimiento en exceso de las células vegetales (antibióticos, cepas auxótrofas);
- El uso de "bloques de células" permite una relación más alta de *Agrobacteria* con respecto a célula vegetal en comparación con la suspensión en biorreactor;
- Como las células en el bloque de células no son agitadas, se logra un contacto vector con célula más íntimo y no hay cizallamiento;
- Debido a la alta biomasa concentrada en la segunda fase de cultivo o periodo se necesitan cantidades más bajas de compuestos caros (por ejemplo, inductores (acetosiringona), hormonas, precursores para la producción de metabolitos, etc.);
- La segunda fase del cultivo se producen fuera del biorreactor, que se usa para la producción de las células vegetales. Esto permite, por ejemplo, el uso de estrategias de fermentación continuas en la primera fase de cultivo para asegurar el suministro constante de células en suspensión. Esto produce una utilización mejor y más económica del caro biorreactor relativo y permite capacidades más altas;
- Debido a la estructura porosa del bloque de células, la limitación del suministro de oxígeno es menos crítica.

En comparación con el uso de plantas transgénicas, el sistema según la divulgación permite recuperar un producto deseado más rápidamente y ofrece una contención completa sin problemas ambientales o riesgos y no garantiza mezcla con la cadena alimentaria.

En comparación con el uso de células en suspensión transgénicas estables, la divulgación proporciona velocidad más alta de gen a producto, productividad más alta y permite la producción de productos tóxicos que pueden dificultar la regeneración de una línea celular establemente transformada.

La divulgación se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 representa T-ADN de vectores de expresión basados en las series pTRA, pUTA y TRBO que contienen secuencias de diferentes proteínas fluorescentes con diferentes señales de direccionamiento. (A) pTRAc rfp-AH para la expresión de una DsRed secretada, (B) pTRAc rfp-ERH para la expresión de una DsRed retenida en ER, (C) pTRAc rfp-H para la expresión de una DsRed citosólica, (D) pTRAc rTPrfp-H para la expresión de una DsRed dirigida a plástido, (E) pTRAc glyDS-zenH para la expresión de una DsRed dirigida a cuerpo de proteína, (F) pTRAc rTPgfp para la expresión de una GFP dirigida a plástido, (G) pUTA TPPrfp para la expresión de una DsRed dirigida a plástido, (H) TRBO-G para la expresión de una GFP citosólica usando un replicón del virus del mosaico del tabaco. El esqueleto de vector de pTRA se basa en pPAM (GenBank AY027531). El esqueleto de vector de pUTA contiene la proteína de iniciación de la replicación trfA para la replicación de plásmidos independiente de la cepa hospedadora de RK2 ori. El esqueleto de TRBO se origina a partir de pCB301 (GenBank AF139061). LB y RB, borde izquierdo y derecho del T-ADN; SAR, región de unión al andamiaje; P y pA, promotor 35S con potenciador y terminador duplicados del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); CHS, 5'-UTR de gen de chalcona sintetasa (*P. hortense*); TL, 5'-UTR del virus del grabado del tabaco (TEV); SP, péptido señal optimizado en codón de mAb24 murino; TP, péptido de tránsito de GBSSI de *H. vulgare*; rTP, péptido de tránsito de GBSSI de *S. tuberculosis*; DsRed, proteína fluorescente roja de *Discosoma* sp.; glyDs, variante de DsRed con sitio de N-glucosilación; zen, extremo N de gamma-zeína de *Zea mays*; GFP, proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (mutante S65C, mutante de ciclo 3); RK2 ori, origen de replicación de amplio espectro de hospedador; bla, gen beta-lactamasa; ColE1 ori, origen de replicación (*E. coli*); His6, marca de histidina; KDEL, marca de retención de ER; RBS, sitio de

unión al ribosoma; Pnos y pAnos, promotor y terminador de la nopalina sintasa; npt II, gen de neomicina fosfotransferasa; replicasa, proteína 126K/183K del virus del mosaico del tabaco (TMV); MP, proteína de movimiento de TMV; Rib, ribozima.

5 La Fig. 2 representa las regiones de T-ADN de vectores de expresión de la serie pTRA que contienen secuencias de diferentes anticuerpos. (A) pTRAp 2G12F-Ds para la co-expresión de la cadena pesada del anticuerpo 2G12, cadena ligera del anticuerpo 2G12 y DsRed dirigida a plástido; (B) pTRAp 2G12F-Ds para la co-expresión de la cadena pesada del anticuerpo 2G12 retenida en ER, cadena ligera del anticuerpo 2G12 retenida en ER y DsRed dirigida a plástido; (C) pTRAk MTAD para la co-expresión de cadena pesada del anticuerpo M12, cadena ligera del anticuerpo M12 y DsRed retenida en ER. SPg, péptido señal de la cadena gamma de Ig humana; 2G12HC, cadena pesada gamma de anti-Ig de gp120 de VIH-1 2G12 humana; SPk, péptido señal de cadena kappa de Ig humana; 2G12LCF, cadena ligera kappa de anti-Ig de gp120 de VIH-1 2G12 humana; pat, fosfinotricina acetiltransferasa; M12HC, cadena pesada gamma de Ig M12 humana; M12LC, cadena ligera lambda de Ig M12 humana (véase también la Fig. 1)

15 La Fig. 3 representa T-ADN de vectores de expresión basados en las series pSS que contienen secuencias de triptófano descarboxilasa con diferentes señales de direccionamiento (S. Di Fiore et al., "Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and in vivo function and leads to a lesion-mimic phenotype", *Plant Physiol* 129: 1160-1169, 2002). El esqueleto de vector se origina de pPCV002. (A) pT-CYT para la expresión de una triptófano descarboxilasa (TDC) citosólica; (B) pT-CHL para la expresión de una TDC dirigida a plástido. Ω, 5'-UTR del virus del mosaico del tabaco; marcas, marcas c-myc/His6; pAocs, terminador de la octopina sintasa (véase también la Fig. 1, 2)

20 La Fig. 4 representa T-ADN de la expresión pTRAk Msp1(383319)ERH-Ds que contiene un fragmento de la proteína de la superficie 1 de merozoito 3D7 de *Plasmodium falciparum* (GenBank XM\_001352134).

25 La Fig. 5 muestra fotos macroscópicas de células BY-2 5 días después de la infección con un *Agrobacterium* que contiene los casetes de expresión para la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano (2G12) y un casete de expresión para una proteína fluorescente roja dirigida a plástido (DsRed) bajo luz blanca (A) y bajo luz de excitación verde para la visualización de fluorescencia de DsRed (B). Arriba: "bloque de células" infiltrado. Abajo: células en suspensión recogidas de co-cultivo con *Agrobacterium* a una DO final de 0,05 (izquierda) y a una DO final de 0,1 (derecha).

30 La Fig. 6 muestra fotos microscópicas representativas de células BY-2 5 días después de la infección con un *Agrobacterium* que contiene los casetes de expresión para la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano (2G12) y un casete de expresión para una proteína fluorescente roja dirigida a plástido (DsRed) bajo luz blanca (A,B) y bajo luz de excitación verde para la visualización de fluorescencia de DsRed (C,D). Células de un "bloque de células" infectado con agro (A,C). Suspensión células de co-cultivo con *Agrobacterium* a una DO final de 0,1 (B,D).

35 La Fig. 7 muestra fotos de bloques de células BY-2 6 días después de infección con *Agrobacterium* que contiene un casete de expresión para un fragmento Msp1 de *Plasmodium falciparum* (p38-p33-p19) y un casete de expresión para una DsRed dirigida a plástido bajo luz blanca (A) y bajo luz de excitación verde para la visualización de fluorescencia de DsRed (B). Las diferentes densidades ópticas (1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625) se indican sobre la placa de Petri (A). (C) muestra la inmunodetección de Msp1-p19 de *Plasmodium falciparum* mediante transferencia puntual.

40 La Fig. 8 muestra fotografías de un bloque de células BY-2 plano 4 días después de que diferentes cepas de *Agrobacterium* se expusieran sobre las células bajo luz blanca (A), con un filtro de GFP (B) y con un filtro de DsRed (C). (1-3) tres clones de *Agrobacterium* EHA105 transformados con pTRBO-G, (4-6) tres clones de GV2260 *Agrobacterium* transformados con pTRBO-G, (7) EHA105 que contiene pUTA-TPPrf, (8) GV3101::pMP90RK que contiene pUTA-TPPrf y (+) control positivo GV3101::pMP90RK que contiene pTRA-rTPGfp.

45 La Fig. 9 muestra la acumulación de proteínas fluorescentes elegidas de diferente forma en bloques de células 5 días después de la agro-infección. Se transformaron transitoriamente bloques de células de 0,3 g de peso fresco en microcolumnas (A) y bloques de células de 3 g en columnas de 14 ml (B). (1) GFP dirigida a plástido, (2) células no transformadas, (3) DsRed secretada, (4) DsRed retenida en ER, (5) DsRed citosólica, (6) DsRed dirigida a plástido, (7) DsRed dirigida a cuerpo de proteína, (8) co-transformación con DsRed retenida en ER y GFP dirigida a plástido. Las fotos se tomaron bajo luz blanca (izquierda), con un filtro de DsRed (centro) y con un filtro de GFP (derecha). La cantidad extraída de DsRed se muestra en (C).

50 La Fig. 10 muestra fotos de bloques de células BY-2 en columnas de diferentes dimensiones que expresan transitoriamente DsRed. (A) bajo luz blanca, (B) con un filtro de DsRed.

55 La Fig. 11 muestra la influencia de las condiciones de aireación sobre la expresión de DsRed y 2G12 transitoriamente expresadas, respectivamente. (A, B) muestra imágenes de bloques de células aireados de forma diferente en columnas, (A) bajo luz blanca, (B) con un filtro de DsRed. (C) muestra la acumulación niveles de DsRed

y 2G12 en células BY-2 rellenas en columna 140 horas después de la agro-infección. La pérdida de peso de los bloques de células se indica debajo del gráfico.

5 La Fig. 12 muestra geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie de extractos totales y eluatos de células rellenas en columna 5 días después de la infiltración con *Agrobacterium* transgénico. (A) Infección con construcciones de expresión para un anticuerpo M12 secretado o una DsRed que forma cuerpo de proteína (control). (B) Infección con construcciones de expresión para una DsRed secretada o retenida en ER. Las muestras de extracto sobre los geles se corresponden con aprox. 10 mg de peso de células frescas (FCW), las muestras de eluato sobre el gel se corresponden con eluatos de aprox. 20 mg de FCW.

10 La Fig. 13 muestra la acumulación de triptamina en células rellenas transitoriamente transformadas en diferentes momentos de tiempo después de la agro-infección con triptófano descarboxilasa o GFP dirigida de forma diferente. Se añadió triptófano adicional (trp) 18 h después de la agro-infección.

15 La Fig. 14 muestra fotos de bloques de células de *Catharanthus roseus* generadas a partir de cultivos en suspensión pre-cultivados de diferente forma 4 días después de la infiltración con *Agrobacterium* que contiene vectores de expresión en plantas para cualquier DsRed secretada (rAH) o una DsRed retenida en ER (rERH). Las fotos fueron tomadas bajo luz blanca (A) y con un filtro de DsRed (B). Las células en suspensión se cultivaron en medio MS67 o en medio BY-2, respectivamente.

La Fig. 15 muestra una fotografía de un bloque de células BY-2 11 días después de que esporas de diferentes especies de *Aspergillus* se aplicaran sobre el bloque. (A) *A. niger*, (B) *A. nidulans*, (C) *A. flavus*, (D) *A. parasiticus*.

20 La Fig. 16 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de un eluato de células rellenas en columna de 4 días de edad generadas a partir de un cultivo en suspensión no mutante de BY-2 de 5 días de edad (1) y del medio de cultivo del cultivo en suspensión no mutante de BY-2 de 9 días de edad correspondiente (2).

### Ejemplo 1

Comparación de la expresión transitoria en bloques de células con la expresión transitoria en suspensión

25 Con el fin de evaluar la producción de proteínas recombinantes transitoria en un bloque de células según la presente invención, se comparó la expresión transitoria de DsRed y el anticuerpo 2G12 en un bloque de células infiltrado con *Agrobacterium* con el método del estado de la técnica de co-cultivo de células en suspensión con *Agrobacterium* en cultivo líquido.

30 Se usaron *Agrobacterium* recombinante (cepa GV3101::pMP90RK) que aloja el vector binario pTRAp-2G12FER-Ds que contiene los casetes de expresión para la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano (2G12) y un casete de expresión para una proteína fluorescente roja dirigida a plástido (DsRed) en el mismo T-ADN. Ambos genes 2G12 contienen la secuencia KDEL para retención en ER del anticuerpo (Fig. 2B). La secuencia KDEL se usó deliberadamente para evitar la secreción del anticuerpo que permite una comparación directa de la productividad de células de bloques de células y en suspensión.

35 Se prepararon cepas de *Agrobacterium* para la transformación transitoria del siguiente modo. Se iniciaron cultivos a partir de reservas de glicerol inoculando 50 µl en 5 ml de medio YEB (5 g/l de extracto de ternera, 1 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 0,5 g/l de mgSO<sub>4</sub>, pH 7,4, complementado con 50 mg/l de carbenicilina y 25 mg/l de kanamicina). Los cultivos bacterianos se cultivaron a 26 °C durante tres días a una densidad óptica (DO) de aproximadamente 5. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron a DO 1 con medio de infiltración (50 g/l de sacarosa, 2 g/l de glucosa, 0,5 g/l de Ferty<sup>®</sup> 2 Mega (Planta Düngemittel, Alemania), pH 5,3, complementado con acetosiringona 200 µM). La suspensión bacteriana se incubó entonces durante 1 hora a 22 °C antes de la aplicación.

40 Se cultivaron células de *Nicotiana tabacum* L. cv. bright yellow 2 (BY-2) en medio líquido (3 % de sacarosa, 4,3 g/l de sales de Murashige y Skoog, 100 mg/l de inositol, 1 mg/l de tiamina, 0,2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 200 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,6) en la oscuridad en un agitador rotatorio (180 rpm) a 26 °C. Las células se subcultivaron semanalmente en medio fresco usando un 4 % de inóculo.

45 Se manipularon células vegetales y *Agrobacterium* bajo condiciones asépticas usando equipo estéril. Se vertió una alícuota de 50 ml de un cultivo en suspensión de BY-2 de 400 ml de 4 días de edad en un embudo Büchner de 75 ml equipado con un filtro de celulosa de 5,5 cm de diámetro (MN615) y el medio de cultivo se eliminó completamente aplicando un vacío (aproximadamente 500 mbar durante 1 min). El bloque de células resultante se transfirió a una placa de Petri y se determinó el peso de células fresco (FCW) (peso = 4,5 g, diámetro = 5,5 cm, altura = 0,3 cm, densidad = 0,63 g/cm<sup>3</sup>). Entonces se añadieron gota a gota uniformemente 2,5 ml de suspensión de *Agrobacterium* de DO 1 (0,55 ml por gramo de bloque de células) sobre el bloque de células produciendo una infiltración completa. La cantidad de líquido aplicado se ajustó de forma que el bloque de células fuera uniformemente humedecido, pero no completamente inundado para permitir una rápida recuperación de vacíos de aire. El bloque de células agro-infiltrado se cultivó durante 5 días a 26 °C y 95 % de humedad relativa (HR) en la oscuridad.

Para el co-cultivo se añadieron 2,5 ml y 5 ml de suspensión de *Agrobacterium* de DO 1 a 50 ml de cultivo en suspensión BY-2, dando la misma relación y el doble de *Agrobacterium* con respecto a células vegetales que en el bloque de células.

5 Los cultivos de co-cultivo se cultivaron en un agitador rotatorio con 180 rpm a 26 °C en la oscuridad. Las células BY-2 de los cultivos de co-cultivo se recogieron por filtración a vacío después de 5 días y los bloques de células resultantes se transfirieron a placas de Petri. Las células de ambos experimentos fueron macroscópicamente inspeccionadas bajo luz de excitación verde mediante un filtro de emisión roja para la expresión de DsRed (Fig. 5). La fluorescencia roja fue claramente visible en el bloque de células agro-infectadas preparado según la invención. Sorprendentemente, no fue visible fluorescencia roja en las células que se co-cultivaron con *Agrobacterium* en suspensión. El análisis microscópico de las células mostró claramente que se logró una tasa de infección mucho más alta, además de una expresión de DsRed más alta por célula con el método de bloques de células según la invención en comparación con el método del estado de la técnica de co-cultivo en suspensión (Fig. 6).

15 Se extrajeron proteínas solubles de ambos enfoques y se cuantificó DsRed y la acumulación de anticuerpo. Brevemente, se homogeneizaron las células por sonicación (Bandelin, Sonopuls, intervalo 0,9 s, 40 W, 2 x 30 s) en dos volúmenes (peso/volumen) de tampón de extracción (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 500 mM, bisulfato de sodio 10 mM, pH 7,5). El residuo celular se sedimentó por centrifugación (15 min, 13000 g, 4 °C) y el sobrenadante claro se usó para el análisis adicional. Se cuantificó DsRed midiendo la fluorescencia (excitación 530 ± 12,5 nm; emisión 590 ± 17,5 nm) de las proteínas solubles extraídas. Se realizó la cuantificación de anticuerpos por espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento BIACORE™ T200 con proteína A acoplada a un chip sensor CM5 (como se describe en T. Holland et al., "Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture", Biotechnol Bioeng 107: 278-289, 2010).

20 Ni DsRed ni el anticuerpo 2G12 se detectaron en extractos derivados de células en suspensión co-cultivadas. A diferencia, los extractos derivados del bloque infectado con células de agro contuvieron 55 µg de DsRed y 47 µg de anticuerpo 2G12 por gramo de FCW.

25 Este ejemplo muestra que usando un bloque de células según la presente invención, puede lograrse un rendimiento sustancialmente más alto de proteínas recombinantes por expresión transitoria después del co-cultivo con *Agrobacterium* recombinante en el bloque de células en comparación con el cultivo en suspensión. Además, este ejemplo demuestra claramente que la productividad más alta en el bloque de células es debida a una eficiencia de transformación sustancialmente más alta (normalmente 50 %-80 %), además de a una acumulación de producto más alta dentro de la célula.

### Ejemplo 2

Expresión transitoria de antígenos de *Plasmodium falciparum* en bloques de células

Con el fin de probar si los bloques de células pueden usarse para la producción de antígenos de la malaria, se produjeron transitoriamente diferentes proteínas de *Plasmodium falciparum*.

35 Una cepa de *Agrobacterium* recombinante que contiene un vector binario con un casete de expresión para un fragmento del extremo carboxi retenido en ER de Msp1 (p38, p33 y p19) de *Plasmodium falciparum* y un segundo casete de expresión para una DsRed dirigida a plástido (Fig. 4). Las bacterias se cultivaron y prepararon como se describe en el Ejemplo 1. La suspensión de infiltración de *Agrobacterium* se diluyó en serie de DO 1 a DO 0,0625 antes de la infección de las células vegetales.

40 Se usó un cultivo en suspensión de BY-2 de 3 días de edad para generar un bloque de células como se describe en el Ejemplo 1. El bloque de células se cortó en trozos de aproximadamente 5 mm x 5 mm x 10 mm (Fig. 7A). Se transfirieron seis trozos en una placa de Petri y se infiltraron con gotas hasta la saturación (aprox. 150 µl por bloque de células) con suspensiones de *Agrobacterium* de diferentes densidades ópticas. El control negativo se infiltró con medio de infiltración solo (Fig. 7). Después de 6 días de incubación a 20 °C y 95 % de HR, los trozos de bloques se analizaron para fluorescencia de DsRed y expresión de antígenos. DsRed se observó macroscópicamente bajo luz de excitación verde a través de un filtro de emisión roja (Fig. 7B). Para la detección de la proteína de *Plasmodium*, las proteínas solubles se extrajeron como se describe en el Ejemplo 1 y se aplicó una alícuota de cada extracción sobre una membrana de nitrocelulosa. La presencia de la proteína de *Plasmodium* se visualizó por inmunodetección usando el anticuerpo monoclonal 5.2 contra el dominio p19 y un anticuerpo secundario conjugado con AP seguido de incubación con NBT/BCIP (nitro-azul de tetrazolio / 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato).

50 Se detectó una fuerte fluorescencia de DsRed en todos los bloques infectados con células (Fig. 7B). Solo se detectó una diferencia menor en la intensidad de fluorescencia entre bloques de células infiltradas con una concentración de *Agrobacterium* de DO 1 y bloques de células infiltradas con una suspensión de *Agrobacterium* superior a 10 veces de DO 0,0625. La detección inmunológica clara de la proteína de *Plasmodium* co-transformada en todos los bloques de células infiltrados tampoco reflejó la dilución de 10 veces de *Agrobacterium* (Fig. 7C). El nivel de acumulación más alto se obtuvo por infiltración con una suspensión de *Agrobacterium* de DO 1.

En experimentos adicionales, se expresaron satisfactoriamente otras proteínas de *Plasmodium falciparum* (Pfsp25 solo y en fusión con DsRed; y otra proteína de fusión que consiste en dominios de varias proteínas de la malaria diferentes) en diferentes formatos de bloques de células BY-2 (datos no mostrados). Este ejemplo muestra que la acumulación de proteína recombinante es alta incluso cuando el bloque de células se infiltra con cantidades más bajas de *Agrobacterium*. La invención, por tanto, proporciona un método para una producción más económica que es particularmente importante para aplicaciones industriales a grandes escalas. Esto también muestra que proteínas de la malaria diferentes pueden ser eficientemente expresadas y producidas y que el método desvelado es generalmente adecuado para el desarrollo y la producción de vacunas contra la malaria y vacunas contra otras enfermedades infecciosas.

### 10 Ejemplo 3

Uso de bloques de células para aplicaciones de cribado

Como los bloques de células son altamente homogéneos, también son ideales para fines de cribado. Por tanto, esto se demostró en este ejemplo evaluando la influencia de la cepa de *Agrobacterium* infiltrada y diferentes vectores de expresión en la acumulación transitoria de producto. Se usaron dos vectores de expresión diferentes. El vector binario pUTA-TPPrf que contiene una DsRed dirigida a plástido conducida por el promotor 35S (Fig. 1G), y el vector binario pTRBO-G que contiene un ADNc conducido por el promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (TMV) donde la secuencia de proteínas de la cápside está sustituida por GFP (Fig. 1H) (J.A. Lindbo, "TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector", *Plant Phys* 145: 1232-1240, 2007). Cada vector se introdujo en dos cepas de *Agrobacterium* diferentes. El vector estándar pUTA-TPPrf se introdujo en GV3101::pMP90RK y EHA105; el vector viral pTRBO-G en GV2260 y EHA105 (R. Helens et al., "A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors", *TIBS* 5: 446-451, 2000).

Se usó pTRA-rTPgfp en GV3101::pMP90RK como control positivo (Fig. 1F). Se iniciaron cultivos líquidos de GV-pUTA-TPPrf, EHA-pUTA-TPPrf y GV-pTRA-rTPgfp a partir de reservas de glicerol. Para cultivos de GV-pTRBO-G y EHA-pTRBO-G, se inocularon tres colonias sin verificar obtenidas de una electro-transformación recién hecha con ADN de plásmido para cada cepa. Se cultivaron cepas de *Agrobacterium* en condición normal (Ejemplo 1) con 50 mg/l de carbenicilina y 25 mg/l de kanamicina para GV-pUTA-TPPrf, GV-pTRBO-G y GV-pTRA-rTPgfp, 50 mg/l de carbenicilina para EHA-pUTA-TPPrf y 25 mg/l de kanamicina para EHA-pTRBO-G. Después de 3 días las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron a DO 1 con medio de infiltración. Las suspensiones bacterianas se incubaron durante 3 horas a 22 °C antes de la aplicación. Se generó un bloque de células (peso = 4 g, diámetro = 5,5 cm, altura = 0,3 cm, densidad = 0,56 g/cm<sup>3</sup>) usando 25 ml de un cultivo de BY-2 de 5 días de edad cultivado en condiciones normales (Ejemplo 1). El bloque de células se dispuso invertido en una placa de Petri y entonces se aplicaron 40 µl de cada suspensión de *Agrobacterium* sobre la superficie lisa. El bloque de células infiltrado se incubó a 26 °C con 95 % de HR. Después de 4 días el bloque de células se inspeccionó bajo luz de excitación azul a través de un filtro verde para la expresión de GFP (Fig. 8B) y bajo luz de excitación verde a través de un filtro rojo para la expresión de DsRed (Fig. 8C). La expresión fluorescente de proteínas con el vector viral, además del vector binario estándar, fue claramente menos eficiente cuando EHA105 se usó para transferir las construcciones de expresión en las células vegetales. Este resultado se confirmó infectando bloques de células de 3 g en columnas y por transformación transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* con las mismas suspensiones de *Agrobacterium* (datos no mostrados). Este método de "aplicación de agro" fácil de manipular a pequeña escala también puede usarse para evaluar otro parámetro que puede influir en la expresión de proteínas diana (por ejemplo, condiciones de crecimiento y pretratamiento de *Agrobacterium*, composición de medios de infiltración o condiciones de cultivo del bloque de células infiltradas). Cientos de muestras pueden ser analizadas en paralelo sin exigir equipo técnico, un matraz oscilante de 1 l con 400 ml de cultivo de BY-2 proporcionará material durante 16 veces de bloques de células de 4 g en 5 días, a partir de un cultivo de 400 ml de 11 días de edad pueden generarse 30 bloques de células.

### 30 Ejemplo 4

Expresión transitoria en bloques de células en columnas

Con el fin de probar si es posible generar, infiltrar y mantener bloques de células en columnas, se realizaron varios experimentos. En este ejemplo, versiones dirigidas de forma diferente de la proteína fluorescente roja DsRed y la proteína verde fluorescente GFP se expresaron transitoriamente en un formato de columna de células rellenas.

Se usaron diferentes cepas de *Agrobacterium* que alojan vectores de expresión binarios para una DsRed secretada (Fig. 1A), una DsRed retenida en ER (Fig. 1B), una DsRed citosólica (Fig. 1C), una DsRed dirigida a plástido (Fig. 1D), una DsRed dirigida a cuerpo de proteína (Fig. 1E) y una GFP dirigida a plástido (Fig. 1F). Las suspensiones de *Agrobacterium* para la agro-infección se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Antes de la aplicación, las suspensiones bacterianas se incubaron durante 5 horas a 22 °C. Para los experimentos de co-infección, se mezclaron dos cepas de *Agrobacterium* (que contenían una DsRed retenida en ER y una GFP dirigida a plástido, respectivamente) de DO 1, dando una DO de 0,5 para cada una de las cepas.

Se usaron células en suspensión de BY-2 de 11 días cultivadas en condiciones normales (Ejemplo 1) para generar bloques de células en dos tipos diferentes de columnas de polipropileno estéril. Se usaron micro-columnas de centrifugación (columna Receiver 20  $\mu\text{m}$ , MACHEREY-NAGEL, Alemania, Fig. 8A) con un volumen de 0,7 ml y columnas midi (columna QIAGEN-tip 100, QIAGEN, Alemania, Fig. 9B) con 14 ml de volumen, ambas equipadas con una frita de filtro de polietileno de 20  $\mu\text{m}$ . Se generaron bloques de células vertiendo el cultivo en suspensión en una columna conectada a un vacío. Después de eliminarse completamente el medio por filtración a vacío, se determinaron las dimensiones del bloque de células resultante. Se usó 1 ml del cultivo en suspensión para las micro-columnas, dando un bloque de células de 0,3 g de peso con un diámetro de 0,68 cm, una altura de 1,5 cm y una densidad de 0,54 g/cm<sup>3</sup>. Los bloques de células generados a partir de la suspensión de 10 ml en las columnas midi tuvieron un peso de 3 g, un diámetro de 1,4 cm, una altura de 3,6 cm y una densidad de 0,54 g/cm<sup>3</sup>.

Los bloques de células se infiltraron en la columna pipeteando la suspensión de *Agrobacterium* sobre los bloques de células (1 ml por gramo de bloque de células). Con el fin de lograr una infiltración completa, se aplicó un corto vacío hasta que las primeras gotas de líquido dejaron la columna, pero todavía dejaron la parte superior del bloque de células cubierta con suspensión. Después de incubar los bloques de células infiltrados durante 30 min a 22 °C, el líquido restante se eliminó completamente aplicando vacío a la columna con el fin de restaurar los huecos de aire. La eliminación del líquido aplicado se controló determinando el peso de las células rellenas en columna tratadas. Para garantizar la alta viabilidad de las células durante la siguiente fase de incubación, el aumento de peso debido a la captación de líquido por el bloque de células o células debe preferentemente no superar, por ejemplo, el 15 % del peso de células fresco original (FCW) del bloque. Los bloques de células se cultivaron en las columnas a 26 °C y 92 % de humedad relativa. 5 días después de la agro-infección, las proteínas solubles totales se extrajeron de los bloques de células como se describe en el Ejemplo 1.

La expresión de proteínas fluorescentes fue macroscópicamente detectable en todos los bloques de células infiltrados (Fig. 9) mostrando que diferentes compartimentos de las células en un bloque de células pueden usarse para la producción de proteínas recombinantes. Los bloques de células mostraron una fluorescencia homogénea que indica una administración eficiente de las *Agrobacteria* a cada área del bloque de células. Dependiendo del compartimento diana se observó una clara diferencia en los niveles de acumulación, que osciló de aprox. 40  $\mu\text{g/g}$  de FCW para una DsRed dirigida a plástido a aprox. 160  $\mu\text{g/g}$  de FCW para una DsRed citosólica (Fig. 9C). DsRed dirigida a cuerpos de proteína mostró una alta fluorescencia *in vivo*, pero no fue extraíble debido a la insolubilidad de cuerpos de proteína. La expresión simultánea de DsRed y GFP (Fig. 9A8 y 9B8) mostró que la co-infección con dos cepas de *Agrobacterium* separadas era posible. El tamaño del bloque de células, 0,3 g en micro-columnas o 3 g en columnas de 14 ml, no tuvo efecto sobre los niveles de expresión. Por tanto, se prevé que micro-bloques de células serán muy útiles para fines de cribado y analíticos, por ejemplo para determinar los parámetros óptimos para una producción a gran escala (por ejemplo, condiciones de pre-cultivo, infección y co-cultivo), para evaluar diferentes construcciones de expresión o para desarrollar y estudiar vías metabólicas. Debido a la alta homogeneidad de los bloques de células, son particularmente útiles para diseños estadísticos y experimentos multifactoriales. Para el análisis de alto rendimiento, están disponibles placas filtrantes de 96 pocillos que son compatibles con sistemas automatizados (por ejemplo, placa Receiver de 20  $\mu\text{m}$ , placa filtrante Chromabond<sup>®</sup> MULTI 96, ambas de MACHEREY-NAGEL, Alemania). Los pocillos de estas placas filtrantes son similares a las micro-columnas usadas para la generación e infiltración de bloques de células en este ejemplo. En comparación con el análisis de alto rendimiento en cultivos en suspensión en placas de 96 pocillos, los micro-bloques de células tienen la ventaja de que la expresión transitoria es más eficiente (véase el Ejemplo 1) y que más biomasa está disponible para el análisis. Además de las columnas usadas anteriormente, también se probaron columnas más grandes (Fig. 10). Se observó expresión de DsRed 4 días después de la agro-infección en un bloque de células de 12 g (2,8 cm de diámetro, 3,5 cm de altura) en una columna de 70 ml (jeringa de filtro del kit GenElute<sup>™</sup> HP Plasmid Midiprep, SIGMA, EE.UU.) y en un bloque de células de 87 g (3,7 cm de diámetro, 11 cm de altura) en una columna de 150 ml (columna de polipropileno Chromabond<sup>®</sup> de 150 ml, MACHEREY-NAGEL, Alemania). El bloque de células de 12 g se generó a partir de un cultivo en suspensión de BY-2 de 4 días de edad y se infiltró con un *Agrobacterium* que aloja una construcción de expresión para una DsRed dirigida a plástido (Fig. 2B). El bloque de células de 87 g se generó a partir de un cultivo de 11 días de edad y se infiltró con un *Agrobacterium* que aloja una construcción de expresión para una DsRed retenida en ER (Fig. 1B). La única diferencia con los procedimientos convencionales descritos anteriormente era que el bloque de células de 87 g se infiltró con una suspensión de *Agrobacterium* de DO 0,25. La determinación de la densidad del bloque de células y la confirmación de que se eliminó líquido suficiente para restaurar los huecos de aire se lograron pesando. Los diferentes experimentos también mostraron que células de diferente edad, es decir, días después del subcultivo, son adecuadas para generar un bloque de células según la presente invención. Además, son posibles diferentes formas y tamaños de bloques de células. Este ejemplo muestra que es factible transformar e incubar también bloques de células más grandes bajo condiciones estériles y contenidas. Esto es a diferencia de los sistemas basados en hojas que generalmente no son estériles.

#### Ejemplo 5

Efecto de la elevada aireación sobre la producción de proteínas transitoria

Para investigar la influencia de la aireación sobre el rendimiento de las células rellenas transformadas, se probaron diferentes configuraciones: (1) un bloque de células activamente aireado, (2) un bloque de células pasivamente

aireado, (3) un bloque de células con un canal de aire central, (4) un bloque de células en una columna perforada (Fig. 11A).

La cepa de *Agrobacterium* que aloja el vector binario pTRAp-2G12FER-Ds (Fig. 2B) se cultivó en condiciones normales y se preparó como se describe en el Ejemplo 1.

- 5 Se usaron células en suspensión de BY-2 de 4,5 días de edad cultivadas bajo condiciones normales para generar bloques de células en columnas midi de 14 ml (Ejemplo 4). En los experimentos 1, 2, 4 se generaron bloques de células sólidos, la columna perforada se selló con Parafilm®. En el experimento 3 se colocó una varilla de plástico con un diámetro de 2,5 mm en el centro de la columna. Los bloques de células tuvieron diámetros de 1,4 cm y pesos de 2,1-2,5 g, alturas de 2,5-2,7 cm y densidades de aproximadamente 0,57 g/cm<sup>3</sup>. Después de la infiltración con suspensión de *Agrobacterium* y eliminación del líquido (Ejemplo 4), la varilla de la columna 3 y la junta de Parafilm® de la columna 4 se eliminaron dando un bloque de células con un canal de aire central y un bloque de células con suministro de aire adicional desde los lados, respectivamente. Las columnas se cultivaron a 26 °C en una estufa de incubación con 92 % de HR. La columna 1 está conectada a una bomba de aire, que se colocó dentro de la estufa de incubación para el suministro con aire de 26 °C y 92 % de HR. La bomba tuvo una capacidad de 50 l/h y se estableció a un bombeo periódico (15 min encendida, 45 min apagada). 6 días después de la agro-infección se determinó el peso de los bloques de células y las proteínas solubles se extrajeron de los bloques de células y se analizaron para DsRed y la expresión de anticuerpos 2G12 (como se describe en el Ejemplo 1). Debido a la diferente pérdida de peso de los bloques de células, la cantidad de DsRed y anticuerpo 2G12 se calculó basándose en el FCW al inicio del cultivo en la estufa de incubación (Fig. 11C). Los resultados muestran que una pérdida de humedad debido a la evaporación bien mediante aireación forzada (Fig. 11C1) o bien como una elevada superficie (Fig. 11C4) tiene un efecto negativo sobre la productividad de las células rellenas. Tanto la acumulación de DsRed dirigida a plástico como también la acumulación del anticuerpo retenido en ER se reducen en células, que muestra una pérdida de peso superior al 20 %. Por tanto, deben usarse condiciones de cultivo, que minimizan la desecación de los bloques de células (por ejemplo, aumentando la humedad relativa o re-humedeciendo los bloques de células). Por otra parte, los resultados muestran que a esta dimensión la aireación es suficiente y no se necesitan medidas para el mejor suministro de oxígeno e intercambio de gases.

#### Ejemplo 6

##### Recolección no destructiva de productos secretados de células rellenas

- 30 Para determinar si las proteínas secretoras recombinantes pueden eluirse sin destruir las células, se rellenan células en suspensión de BY-2 en columnas y se transformaron transitoriamente mediante agroinfección. Se usaron diferentes cepas de *Agrobacterium* que contenían construcciones de expresión para un anticuerpo monoclonal secretor M12 junto con una DsRed retenida en ER (Fig. 2C), una DsRed secretora (Fig. 1A), DsRed retenida en ER (Fig. 1B) y una DsRed que forma cuerpos de proteína (Fig 1E), respectivamente, para el experimento. El anticuerpo M12 (150 kDa) y DsRed (108 kDa) son ejemplos de proteínas secretadas grandes. Como la DsRed retenida en ER es intracelular, es un control adecuado para examinar si las células vegetales son alteradas durante la incubación o elución. Se empleó DsRed formadora de cuerpos de proteína insoluble como control para los extractos de células completas.

- 40 Se usaron células en suspensión de BY-2 de 11 días de edad cultivadas en condiciones normales (Ejemplo 1) para generar bloques de células en columnas. Se vertieron 10 ml del cultivo en suspensión en una columna de polipropileno de 14 ml (diámetro 1,4 cm, altura 9 cm) equipada con una frita de filtro de polietileno de 20 µm. El medio se eliminó completamente por filtración a vacío y el bloque de células resultante (peso = 3 g, diámetro = 1,4 cm, altura = 3,6 cm, densidad = 0,54 g/cm<sup>3</sup>) se infiltró dentro de la columna pipeteando la suspensión de *Agrobacterium* sobre el bloque de células (1 ml por gramo de bloque de células). Con el fin de lograr una infiltración completa, se aplicó un corto vacío hasta que las primeras gotas de líquido dejaron la columna pero todavía dejaron la parte superior del bloque de células cubierto con la suspensión. El bloque de células infiltrado se incubó durante 30 min a 22 °C y entonces el líquido restante se eliminó completamente para restaurar la estructura porosa aplicando vacío a la columna. Los bloques de células se cultivaron en las columnas a 26 °C y 92 % de humedad relativa. 5 días después de la agro-infección las proteínas solubles totales de muestras de 200 mg de FCW de las células rellenas se extrajeron con 2 volúmenes de tampón de extracción (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 500 mM, bisulfito de sodio 10 mM, pH 7,5). Con el fin de solo recuperar proteínas secretadas, las restantes células de la columna rellena se lavaron con tampón de extracción del siguiente modo. Se aplicaron 3 ml de tampón a una columna y se aspiraron en el bloque de células por un corto vacío. Después de 30 min de incubación, el tampón se recogió por vacío y se aplicó otra vez sobre las células. Después de tres etapas de lavado consecutivas se recuperaron 2,7 ml de eluato y posteriormente se clarificaron por centrifugación. Se analizaron preparaciones de proteína extraíble total y proteínas eluibles para el contenido de proteína recombinante sobre geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie (Fig. 12). Las cantidades de proteína cargadas sobre los geles se correspondieron con las proteínas extraíbles totales del bloque de células de 10 mg y con las proteínas eluibles del bloque de células de 20 mg. Las intensidades de las bandas de proteína recombinante son casi las mismas en el extracto y eluato para el anticuerpo (Fig. 12A) y para DsRed (Fig. 12B), respectivamente. Esto significa que en ambos casos puede eluirse aproximadamente el 50 % de la proteína recombinante totalmente producida. Sin embargo, la cantidad de proteínas hospedadoras contaminantes era más baja en las muestras de elución.

La cantidad de anticuerpo M12 se cuantificó por espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales con proteína A acoplada a un chip sensor, la cantidad de DsRed se determinó por fluorescencia. Se eluyeron aproximadamente el 55 % (96 µg/g de FCW) de M12 secretor totalmente producido (175 µg/g de FCW) y 40 % (28 µg/g de FCW) de la DsRed secretora (70 µg/g de FCW). La presencia de solo una fracción (inferior al 1 %) de la DsRed retenida en ER totalmente producida (120 µg/g de FCW) en las muestras de elución indica que las células no fueron dañadas durante el cultivo o durante la elución de las proteínas secretadas (véase también la Fig. 12B).

Si se usa el método del estado de la técnica de transformación transitoria de hojas de planta o plantas completas es factible una preparación selectiva de productos secretados a una escala analítica recogiendo líquido de lavado intercelular, pero poco práctico a una mayor escala. Por lo tanto, a gran escala los productos secretados tienen que recuperarse de extractos de biomasa completa. Así, el producto deseado tiene que purificarse a partir de una mezcla compleja de compuestos hospedadores (por ejemplo, proteínas, metabolitos, ligninas, celulosas). En particular, los compuestos fenólicos son problemáticos con respecto al procesamiento y purificación aguas abajo. A este respecto, la presente invención elude estos problemas, ya que los productos secretados pueden ser directamente eluidos del bloque de células sin destruir las células vegetales y con un mínimo de compuestos hospedadores contaminantes. Además, debido a la escalabilidad, el método de bloques de células puede implementarse a una gran escala industrial. Es concebible que bajo condiciones de elución y cultivo optimizadas la elución repetida de productos secretados de células rellenas producirá rendimientos mucho más altos del producto deseado.

### Ejemplo 7

Producción de un metabolito secundario novedoso por ingeniería metabólica

Con el fin de establecer una nueva vía biosintética en células rellenas, se expresó transitoriamente la enzima triptófano descarboxilasa (TDC; EC 4.1.1.28), que no existe en *N. tabacum* en bloques de células de BY-2.

La TDC es una enzima citosólica que cataliza una etapa temprana de la vía biosintética del alcaloide terpenoide indol por descarboxilación de 1-triptófano para producir el protoalcaloide triptamina. La triptamina es un precursor común de un grupo de metabolitos secundarios terapéuticamente relevantes (por ejemplo, los fármacos antineoplásicos vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus*). Con el fin de aumentar adicionalmente el rendimiento del metabolito deseado, el triptófano precursor se alimentó en una segunda etapa a los bloques de células después de la transformación.

Se rellenaron células en suspensión de BY-2 de 4 días de edad en columnas de 14 ml como se describe en el Ejemplo 4 dando bloques de células de 2 g de FCW con una densidad de 0,58 g/cm<sup>3</sup>. Los bloques de células se transformaron transitoriamente por duplicado mediante agro-infección. La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK transformada con construcciones de expresión de planta para tanto una proteína verde fluorescente dirigida a plástido (GFP) (Fig. 1F), una TDC dirigida a plástido (Fig. 3A) como una TDC citosólica (Fig. 3B) se cultivaron en condiciones normales (Ejemplo 1).

Las cepas de *Agrobacterium* se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron y se ajustaron a una DO de 1 con medio de infiltración. La suspensión bacteriana se incubó durante 4 horas a 22 °C antes de la aplicación sobre bloques de células vegetales.

Cada bloque de células se infiltró con 2 ml de suspensión de *Agrobacterium*, se incubó durante 30 min a 22 °C, se secó por aspiración por vacío y se cultivó adicionalmente a 26 °C y 92 % de humedad relativa. 18 horas después de la agro-infección, los bloques de células se infiltraron otra vez o bien con 2 ml de disolución de triptófano (50 mM en medio de infiltración semi-concentrado) o bien con 2 ml de medio de infiltración semi-concentrado. Después de la incubación de los bloques de células infiltrados durante 30 min a 26 °C, las disoluciones se eliminaron otra vez completamente por vacío y las células rellenas en columna se colocaron de nuevo en el armario de cultivo. Se tomaron muestras de aproximadamente 250 mg de FCW a 69 h, 91 h y 112 h después de la agro-infección y se guardaron a -80 °C. Se extrajo triptamina y se ensayó según el método de R.S. Sangwan et al., "Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of 1-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf", *Anal Biochem* 255: 39-46, (1998), con modificaciones menores.

En resumen, se extrajeron compuestos solubles en agua de las muestras de células por sonicación en 2 volúmenes (v/v) de tampón de extracción (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 500 mM, bisulfato de sodio 10 mM, pH 7,5) (véase el Ejemplo 1). Después de añadir 0,9 ml de agua destilada a 0,1 ml del extracto claro, se añadieron 2 ml de NaOH 5 M y 3,5 ml de acetato de etilo. La emulsión se mezcló agitando con vórtex durante 10 s y se dispuso a 4 °C durante 16 h para la separación de fases. La fase orgánica superior se sometió a análisis fluorométrico usando un espectrómetro de luminiscencia Aminco Bowman AB2 (Spectronic Instruments, Rochester, NY). Se midió la fluorescencia de triptamina a longitudes de onda de 280 nm de excitación y 350 nm de emisión con anchura de ranura de 4 nm para la luz de excitación y de emisión y el voltaje de fotomultiplicador establecido a 575 V.

Los niveles de triptamina detectados muestran que una TDC activa se expresó en los plástidos y en el citosol, respectivamente (Fig 13). Las enzimas introducidas convirtieron el triptófano endógeno en la novedosa sustancia triptamina. El alimentar triptófano adicional a las células que expresan transitoriamente TDC condujo a un claro

aumento en la producción de triptamina (5 veces para la TDC dirigida a plástido, casi 10 veces para la TDC citosólica).

Este ejemplo también muestra que el método según la invención puede usarse para la producción de un metabolito. Además, demuestra que un bloque de células puede no solo transformarse para, por ejemplo, producir una enzima (TDC), sino también que sustratos y/o precursores pueden ser fácilmente suministrados a las células en una etapa posterior con el fin de aumentar el rendimiento de producto. Por tanto, la presente invención también incluye posibilidades para administrar cualquier sustancia de interés a las células con el fin de optimizar la formación de producto (por ejemplo, nutrientes de planta adicionales, inductores, inhibidores), por ejemplo, por etapas de transformación repetida, infiltración y de incubación. La manipulación del metabolismo celular puede tener lugar durante, antes y/o después de suministrar la información genética por cualquier combinación de aplicar compuestos y genes adecuados.

Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente que los bloques de células preparados a partir de cultivos en suspensión no mutantes, mutados y/o transgénicos también pueden manipularse sin transformación, es decir, aplicando compuestos diferentes. Esto en particular significa que los rendimientos de compuestos que existen de forma natural pueden aumentarse usando bloques de células según la presente invención y añadiendo sustratos, hormonas, inhibidores y/o precursores adecuados a ellas.

#### Ejemplo 8

Bloques de células de cultivos en suspensión de diferentes especies de planta

Además de células en suspensión de BY-2 de *N. tabacum*, se usaron varias otras suspensiones de células vegetales para generar bloques de células.

#### *Catharanthus roseus*

Se cultivaron células de *C. roseus* en medio MS67 (3 % de sacarosa, 4,4 g/l de sales de Murashige y Skoog, 0,6 mg/l de tiamina, 0,2 mg/l de kinetina, 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, pH 5,8) o en medio de BY-2 (Ejemplo 1) en la oscuridad en un agitador rotatorio (180 rpm) a 26 °C. Las células se subcultivaron semanalmente (20:100) en medio fresco.

#### *Arabidopsis thaliana*

Se cultivaron células de *A. thaliana* en medio ARA (3 % de sacarosa, 4,4 g/l de sales de Murashige y Skoog, 0,5 mg/l de ácido naftalenoacético, 0,1 mg/l de kinetina, pH 5,7) con 16 h de luz / 8 h de oscuridad en un agitador rotatorio (180 rpm) a 26 °C. Las células se subcultivaron semanalmente (15:100) en medio fresco.

#### *Nicotiana benthamiana*

Se cultivaron células de *N. benthamiana* en medio de BY-2 (ejemplo 1) en la oscuridad en un agitador rotatorio (180 rpm) a 26 °C. Las células se subcultivaron semanalmente (20:100) en medio fresco.

Se prepararon bloques de células de diferentes formas a partir de cada cultivo en suspensión. Para los experimentos se usaron cultivos de 4 a 5 días de edad. Se generaron bloques de células similares a galleta de diferente espesor (0,2-0,5 cm) como se describe en el Ejemplo 1. Los bloques de células de aproximadamente 2 a 4 cm de altura se produjeron en columnas midi de 14 ml como se describe en el Ejemplo 4. Dependiendo de la especie de planta, se obtuvieron diferentes densidades de los bloques de células. La densidad de los bloques de células de *C. roseus* fue normalmente 0,65-0,75 g/cm<sup>3</sup>, bloques de células de *A. thaliana* tuvieron una densidad de aproximadamente 0,55-0,67 g/cm<sup>3</sup> y bloques de *N. benthamiana* tuvieron una densidad de aproximadamente 0,6-0,7 g/cm<sup>3</sup>.

Bloques de células de *C. roseus*, *A. thaliana* y *N. benthamiana* infiltrados con *Agrobacteria* que alojan el vector binario pTRAp-2G12FER-Ds (Fig. 2B) mostraron expresión de DsRed macroscópicamente detectable. La producción del anticuerpo 2G12 también se confirmó para cada especie de planta probada por espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales como se describe en el Ejemplo 1.

De forma interesante, dependiendo del medio usado para el cultivo en suspensión de *C. roseus*, se observó una clara diferencia en los niveles de expresión. Esto se analizó adicionalmente transformando bloques de células de *C. roseus* generados a partir de células cultivadas en medio MS67 o medio BY-2 con dos construcciones de expresión de DsRed diferentes, pTRAc rfp-AH y pTRAc rfp-ERH (Fig. 1A, B). Tanto la DsRed secretada como la retenida en ER se acumularon mucho más en células que se cultivaron en medio BY-2 (Fig. 14). Esto muestra la importancia de una optimización de también las condiciones de pre-cultivo para lograr la alta transformación y/o alta síntesis de producto. Los experimentos mostraron que la presente invención puede aplicarse a células vegetales de diferentes especies.

Es muy conocido para aquellos expertos en la materia que condiciones de cultivo (por ejemplo, temperatura, aireación, agitación velocidad, composición de la luz, etc.) y/o composición del medio de cultivo (por ejemplo, nutrientes, hormonas, pH, conductividad, osmolaridad etc.) son factores determinantes para las características

5 morfológicas y fisiológicas de un cultivo en suspensión de plantas. La variación de cada factor puede tener influencia sobre el rendimiento de las células vegetales en las etapas posteriores. Esto significa que las condiciones de cultivo y/o composiciones de medio tienen que optimizarse para cualquier producción. Además de la optimización de la producción del material de partida, los parámetros de infiltración (por ejemplo, densidad de *Agrobacterium*, tiempo de contacto, composición del medio de infiltración) y las condiciones de cultivo del bloque de células (por ejemplo, duración, temperatura, aireación, alimentación, aplicación de aditivos) tienen que optimizarse para cualquier línea de células vegetales y para cualquier producto.

#### Ejemplo 9

Uso de células rellenas como sustrato para el cultivo de patógenos

10 Se generó un bloque de células de 3,64 ml (peso = 2 g, diámetro = 5,5 cm, altura = 0,15 cm, densidad = 0,55 g/cm<sup>3</sup>) usando 50 ml de un cultivo de BY-2 de 4 días de edad cultivado en condiciones normales (Ejemplo 1). El bloque de células se dispuso en una placa de Petri vacía y se infiltró con 1 ml de medio de infiltración (50 g/l de sacarosa, 2 g/l de glucosa, 0,5 g/l de Fert 2 Mega (Planta Düngemittel, Alemania), pH 5,3) que fue absorbido completamente por el bloque de células (peso del bloque de células = 3 g; densidad = 0,825 g/cm<sup>3</sup>). Se ha encontrado que esta cantidad de volumen (es decir, menor o igual a 1 ml por 2 gramos de bloque de células) es favorable para el inicio de la incubación de los bloques de células en placas Petri debido a que los huecos de aire son generados en el plazo de algunas horas. Esto se ha confirmado por mediciones de control de la densidad del bloque de células que disminuyó a menos de 0,6 g/cm<sup>3</sup> debido a la evaporación. Y, lo que es más importante, cantidades más altas de líquido (es decir, superiores a 1 ml por 2 gramos de bloque de células) fueron altamente perjudiciales debido a que, debido al exceso de líquido, los huecos de aire no pudieron reconstituirse produciendo un bloque de células que tuviera una densidad que era demasiado alta para soportar apropiadamente la viabilidad celular o incluso para prevenir la muerte celular.

25 La siguiente etapa de tratamiento consistió en aplicar un pequeño volumen de 20 µl de suspensiones de esporas de cuatro especies de *Aspergillus* diferentes (Fig. 15; A - D) sobre la superficie del bloque de células. El bloque de células se incubó durante 11 días y luego se fotografió (Fig. 15).

Este ejemplo muestra que el bloque de células vegetales puede usarse como sustrato de crecimiento para diferentes especies de *Aspergillus*. Se seleccionó *Aspergillus* como representante como patógeno vegetal, pero también como representante como patógeno humano y animal.

30 En este ejemplo, el bloque de células se preparó a partir de células en suspensión de BY2 no mutadas para el posterior cultivo de hongos. Aquellos expertos en la materia apreciarán que también pueden usarse células en suspensión transgénicas. En particular, pueden usarse bloques de células transgénicas que producen péptidos antifúngicos, proteínas o compuestos y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos puede ser estudiado. Igualmente, bloques de células generados a partir de células no mutadas pueden primero someterse a un tratamiento de transformación y entonces usarse para estudiar el impacto de los productos sobre el crecimiento del patógeno fúngico. Aquellos expertos en la materia también aceptarán que el método también puede usarse para estudiar el impacto de compuestos antibacterianos. El uso de bloques de células en placas de multi-titulación para aplicaciones de cribado de alto rendimiento se describe en el Ejemplo 11 a continuación y es obvio que estos ejemplos también pueden combinarse.

#### Ejemplo 10

40 Recolección no destructiva de un producto secretado del bloque de células generado a partir de una línea celular en suspensión transgénica

45 Se generaron cultivos en suspensión de BY2 transgénicas después de la transformación con una construcción de expresión para un anticuerpo monoclonal M12 secretor junto con una DsRed retenida en ER (Fig. 2C). Después de la selección en placas que contienen kanamicina, se transfirieron callos transgénicos a medio líquido para establecer cultivos en suspensión altamente homogéneos. Los cultivos en suspensión se sub-cultivaron semanalmente transfiriendo 4 % del cultivo en suspensión en medio líquido fresco (Ejemplo 1).

50 Células en suspensión de un cultivo en suspensión de 5 días de edad fueron o bien recogidos para generar los bloques de células según la presente divulgación o bien las células se cultivaron adicionalmente en cultivo en suspensión. Tanto los bloques de células como los cultivos en suspensión se incubaron durante otros 4 días. Se prepararon bloques de células de 2 g de FCW (peso de células fresco) como se describe en el Ejemplo 6 usando columnas de polipropileno de 14 ml. Otra vez, se monitorizó cuidadosamente la constitución de los huecos de aire y se controló durante toda la incubación / cultivo midiendo la densidad del bloque de células colado del que se había eliminado el medio líquido. Por consiguiente, una humedad relativa del 90 % fue siempre garantizada durante la incubación del bloque de células a 26 °C para prevenir el secado de las células dentro del bloque de células.

55 Las proteínas solubles totales de muestras de 400 mg de FCW de los bloques de células o de las células del cultivo en suspensión (separadas del medio por filtración a vacío) se extrajeron con 2 volúmenes de tampón de extracción (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 500 mM, bisulfito de sodio 10 mM, pH 7,5).

- Se recuperaron anticuerpos secretados de las células rellenas en columna lavando las células rellenas en columna con tampón de extracción (Ejemplo 6). Brevemente, se aplicaron 2 ml de tampón a una columna de 2 g y se aspiraron en el bloque de células por un corto vacío. Después de 30 min de incubación el tampón se recogió por vacío y se aplicó otra vez sobre las células. Después de tres lavados consecutivos se recuperaron 1,6 ml de eluato.
- 5 Las muestras recogidas del medio de suspensión original se usaron para comparación.
- Se midieron concentraciones de anticuerpo por SPR en una superficie de proteína A (inmovilizada por acoplamiento a amina) usando el anticuerpo humano purificado H10 producido en células CHO como patrón. Todas las muestras se analizaron en el intervalo lineal de la curva de dosis-respuesta. Se determinó DsRed por fluorescencia usando un patrón de DsRed.
- 10 A pesar del hecho de que el cultivo en suspensión había alcanzado una alta biomasa de células, no se detectó anticuerpo en el sobrenadante de cultivo en suspensión. Así, la fracción de producto recombinante secretado fue del 0 %. La acumulación intracelular del anticuerpo M12 fue 4,02 µg por gramo de FCW de células en suspensión de BY2 transgénicas. El rendimiento total (anticuerpo en el sobrenadante de células más anticuerpo dentro de las células) fue así también de 4,02 µg por gramo.
- 15 A diferencia, el rendimiento total de M12 alcanzó 11,4 µg por gramo de bloque de células, que se corresponde con un aumento de rendimiento total sustancial del 284 %. Y, lo que es más importante, fue posible eluir anticuerpo secretado del bloque de células. El rendimiento de producto secretado fue 1,4 µg de anticuerpo M12 por gramo de bloque de células, que se corresponde con el 12 % del rendimiento total.
- 20 Este ejemplo demuestra que es posible derivar un producto de proteína recombinante de un bloque de células generado a partir de un cultivo en suspensión transgénico y que los rendimientos han aumentado significativamente el 284 % en comparación con el control de células suspensas.
- El rendimiento de DsRed retenida en ER aumentó el 70 % en células del bloque de células en comparación con las células en suspensión (5,2 µg/g de FCW y 3,0 µg/g de FCW, respectivamente).
- 25 Este ejemplo también ilustra claramente que la incubación de las células en suspensión transgénicas en forma de un bloque de células no solo permite que el producto se recoja de una manera concentrada (en comparación con el sobrenadante de cultivo celular en suspensión) que es altamente beneficioso para el procesamiento corriente abajo (incluyendo una reducción en tanto el tiempo de proceso como los costes).
- 30 Y, lo que es más importante, el bloque de células también proporciona un punto de entrada excelente para usar tampones diferentes del medio de cultivo celular para maximizar la elución del producto (aquí una proteína diana recombinante que ha sido secretada de las células) y así el bloque de células proporciona beneficios adicionales con respecto a las células en suspensión. Los sobrenadantes del cultivo en suspensión contuvieron cantidades mucho más altas de polisacáridos que eluyen de las células rellenas en columna. Se prefiere una baja cantidad de polisacáridos, debido a que los polisacáridos gelatinosos previenen procesos corriente abajo como filtración y ultrafiltración.
- 35 Además, el porcentaje de proteína recombinante recogida que ha sido secretada aumentó considerablemente del 0 % para las células en suspensión al 12 % para el bloque de células generadas según la invención.
- Finalmente, este ejemplo ilustra que el rendimiento global en el bloque de células también es significativamente elevado en comparación con las mismas células cultivadas como células en suspensión.
- 40 Aquellos expertos en la materia también apreciarán fácilmente que este método no se limita a la producción y/o aislamiento de proteínas recombinantes de células transgénicas, pero es igualmente aplicable a metabolitos secundarios producidos en células no transgénicas o transgénicas o a otros productos de interés, que incluyen (pero no se limitan a) metabolitos primarios, fibras, oligo- y polisacáridos (celulosa, almidón, hemicelulosas, xilanos, fructanos, etc.), péptidos y proteínas nativos, pigmentos, vitaminas, aromas, ácidos de frutas, o cualquier otro producto de células vegetales.
- 45 Ejemplo 11
- Uso de bloques de células generadas en placas de multi-titulación
- Se generaron bloques de células como se explicó antes usando placas de multi-titulación (placa Receiver de 20 µm (N.º 740686.4), MACHEREY-NAGEL, Alemania) que contenía filtros permeables a líquido en el fondo de la placa.
- 50 Se coló 1 ml de un cultivo en suspensión de BY2 de tabaco no mutante (no transgénico) por pocillo de la placa Receiver para generar 96 microbloques de células. El medio líquido se eliminó completamente por vacío usando el colector de vacío NucleoVac 96 de MACHEREY-NAGEL, Alemania. Los bloques de células resultantes de 0,2 g se analizaron microscópicamente para la presencia de huecos de aire y se confirmó que la densidad del bloque de células resultante era inferior a 0,7 g/cm<sup>3</sup> usando un experimento de control independiente.

Se aplicaron 0,8 ml de suspensión recombinante de *Agrobacterium tumefaciens* (DO 600 nm = 0,1) que lleva plásmidos pTRA que codifican o bien el anticuerpo M12 (Fig. 2C) o bien el anticuerpo 2G12 (Fig. 2A) a cada bloque de células. Para cada construcción de expresión de anticuerpo se infiltraron 32 microbloques de células. Después de 30 minutos se eliminó cualquier líquido para reconstituir los huecos de aire y para restablecer una densidad del bloque de células de menos de 0,7 g/cm<sup>3</sup>. Los bloques de células en la placa de multi-titulación se incubaron entonces durante 4 días a 25 °C y 90 % de humedad relativa. Entonces, los bloques de células se recogieron y los anticuerpos recombinantes se extrajeron (Ejemplo 1). Las concentraciones de anticuerpo se midieron por mediciones de resonancia de plasmones superficiales en una superficie de proteína A usando un instrumento BiacoreT200 (T=25 °C, tampón de electroforesis = HBS-EP) para 32 muestras para cada anticuerpo para determinar la concentración media de anticuerpo y el coeficiente de variación (CV).

El rendimiento medio del anticuerpo M12 fue 117,8 ± 14,4 µg por g de bloque de células y el coeficiente de variación fue del 12,2 %. El rendimiento medio del anticuerpo 2G12 fue 32,3 ± 3,6 µg por g de bloque de células y el coeficiente de variación fue del 11,1 %.

Estos son valores excelentes para ensayos biológicos e ilustran claramente la excelente reproducibilidad y robustez de los ensayos basados en los bloques de células preparadas según la invención.

Esto también muestra que diferentes tamaños y geometrías del bloque de células pueden usarse para diferentes aplicaciones y este experimento demuestra que pueden generarse bloques de células en formato de multi-titulación, que facilita las aplicaciones de alto rendimiento a alta resolución.

Además, también es evidente que los bloques de células en formato de multi-titulación pueden ser manipulados y tratados de la misma forma o similar que aquellos colados en columnas, que incluyen elución de productos secretados o extracelulares, para la posterior cuantificación o análisis.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que los bloques de células también pueden usarse para fines analíticos. Por ejemplo, un bloque de células generado a partir de un cultivo en suspensión transgénico o un bloque de células transformado con genes para anticuerpos recombinantes, que incluye (pero no se limita a), por ejemplo, proteínas de fusión de anticuerpo con la proteína de unión de celulosa o anticuerpos recombinantes unidos a o integrados en la membrana celular (plasmalema) pueden ponerse en contacto con una disolución (muestra) que contiene una sustancia que se une al anticuerpo. La naturaleza porosa del bloque de células es otra vez una clara ventaja aquí debido a que grandes volúmenes pueden ser fácilmente pasados a través del bloque de células para aumentar la sensibilidad. Además, es obvio que etapas de lavado, intercambios de tampón y la aplicación de anticuerpos conjugados con enzima u otros reactivos de detección también pueden fácilmente aplicarse y eliminarse del bloque de células. En una etapa final, puede aplicarse un sustrato que entonces se transforma enzimáticamente en un producto medible para revelar la presencia y concentración de la sustancia.

#### Ejemplo 12

Proteína endógena recuperada de un bloque de células generado a partir de células no mutadas

Células en suspensión de un cultivo en suspensión no mutante de BY-2 de 5 días de edad fueron o bien recogidas para generar los bloques de células o bien las células se cultivaron adicionalmente en cultivo en suspensión. Tanto los bloques de células como los cultivos en suspensión se incubaron durante otros 4 días. Se preparó un bloque de células de 2,5 g de FCW (peso de células fresco) como se describe en el Ejemplo 6 usando columnas de 14 ml de polipropileno. Después de eliminar el líquido, el bloque de células se incubó a 26 °C con una humedad relativa del 90 %. El cultivo en suspensión de BY-2 de 5 días se cultivó adicionalmente a 26 °C en un agitador rotatorio a 180 rpm. Después de 4 días, se recogieron las proteínas secretadas. Las proteínas secretadas se recogieron del bloque de células lavando el bloque con 2,5 ml de tampón como se describe en el Ejemplo 6. Las proteínas secretadas del cultivo en suspensión de 9 días de edad se recogieron eliminando las células del medio de cultivo usando filtración a vacío. Se analizaron una muestra de 25 µl de o bien las proteínas eluidas o bien secretadas en un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie (Fig. 16). Este ejemplo muestra que las proteínas nativas secretadas pueden recuperarse de bloques de células generadas e incubarse según la invención. Cada banda sobre el gel representa una proteína natural diferente. El análisis de gel también mostró que la cantidad y el tipo de las proteínas nativas secretadas difirieron entre células en un bloque de células y células en suspensión. La secreción de ciertas proteínas nativas aumenta sustancialmente en las células de un bloque de células (Fig. 16, indicado por flechas).

Aquellos expertos en la materia también apreciarán fácilmente que este método no se limita a la recuperación de proteínas nativas de células vegetales, sino que es igualmente aplicable a otros productos endógenos de interés, que incluyen metabolitos secundarios, metabolitos primarios, fibras, oligo- y polisacáridos (celulosa, almidón, hemicelulosas, xilanos, fructanos, etc.), péptidos y proteínas nativos, pigmentos, vitaminas, aromas, ácidos de frutas, o cualquier otro producto de células vegetales. Aquellos expertos en la materia reconocerán que pueden generarse bloques de células a partir de células en suspensión seleccionadas de una amplia variedad de especies de plantas, que incluyen, pero no se limitan a, *Catharanthus roseus*, *Taxus spec.*, *Stevia rebaudiana* y *Artemisia annua*.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para la generación de material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido y para el posterior mantenimiento de dicho bloque de células, que comprende las etapas de (i) proporcionar un bloque de células que tiene una estructura porosa separando las células de un cultivo de células vegetales en suspensión, en el que las células separadas de dicho cultivo de células vegetales en suspensión son nativas o transgénicas y capaces de acumular un producto deseado, y en el que el contenido del líquido comprendido por el bloque de células se reduce y ajusta para corresponderse con una densidad del bloque de células entre 0,1 y 0,9 g en peso de células húmedas por  $\text{cm}^3$ , estableciendo así la naturaleza privada de medio y estructurada porosa de dicho bloque de células, y (ii) incubar dicho bloque de células privado de medio y estructurado poroso en un entorno no líquido bajo una humedad relativa del 50 al 100 % para acumular dicho producto deseado sin poner dicho bloque de células sobre o en cualquier contacto con un medio de mantenimiento o de crecimiento.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el contenido de líquido comprendido por el bloque de células se reduce y ajusta para corresponderse con una densidad del bloque de células entre 0,2 y 0,85, preferentemente entre 0,4 y 0,8 g en peso de células húmedas por  $\text{cm}^3$ .
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que las células transgénicas son o bien transitoriamente o bien establemente transformadas con el fin de acumular dicho producto deseado.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, en el que las células comprendidas por el bloque de células como se proporciona en la etapa (i) son transitoriamente transformadas con al menos un vector de expresión que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga antes de ser sometida a la etapa (ii), en el que dicha al menos una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un producto deseado.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (ii) comprende la recogida de un producto deseado.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto deseado está seleccionado del grupo que consiste en proteínas o polipéptidos nativos y heterólogos, metabolitos secundarios, marcadores y resultados analíticos / de diagnóstico.
- 30 7. Uso del material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido obtenido u obtenible por un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para fines analíticos o de diagnóstico.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que las células comprendidas por el bloque de células se incuban en presencia de un organismo o de una sustancia que va a analizarse o diagnosticarse.
9. Herramienta de diagnóstico que comprende material de células vegetales en forma de un bloque de células privado de medio, estructurado poroso y multicapa no tejido obtenido u obtenible por un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

FIG. 1

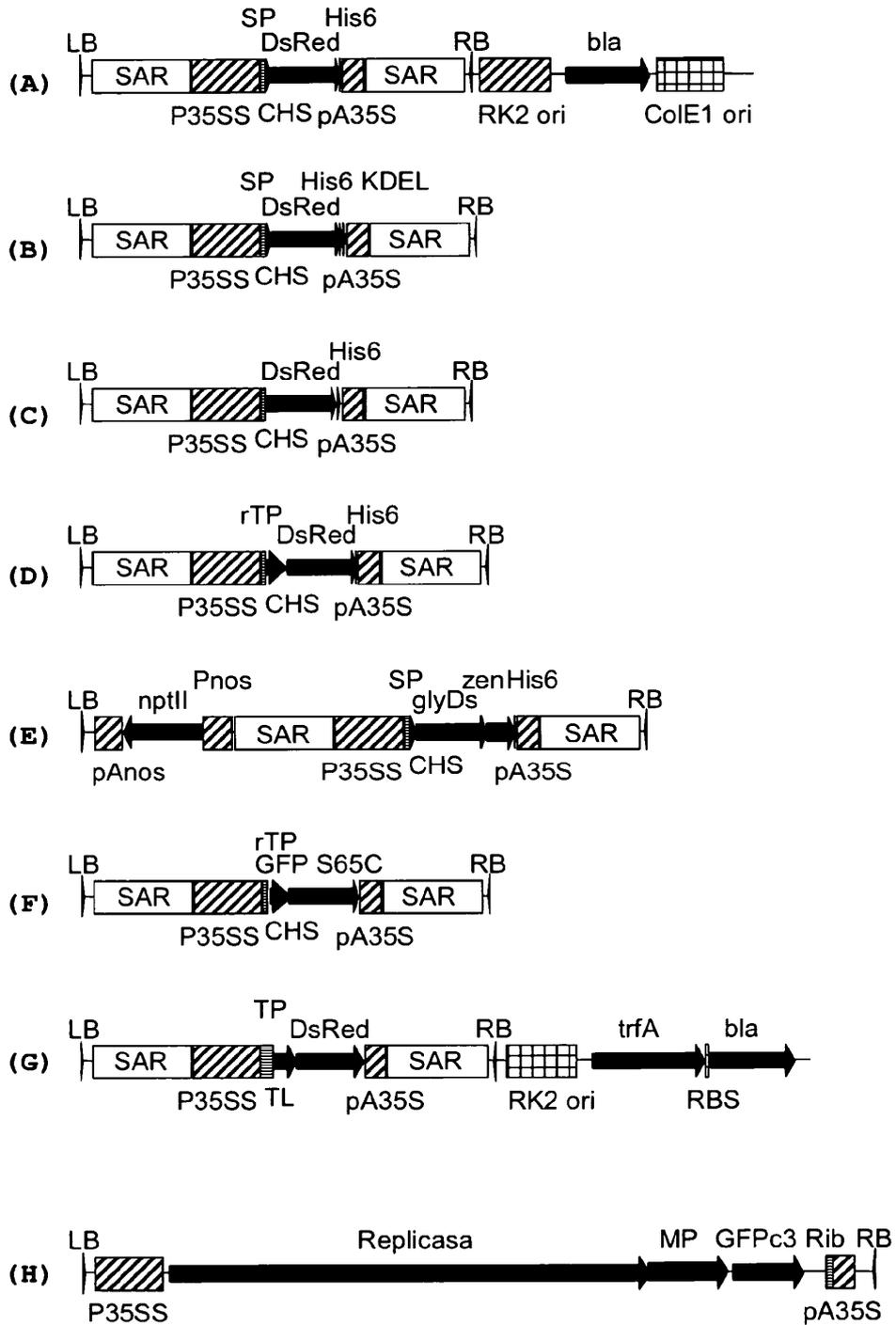


FIG. 2

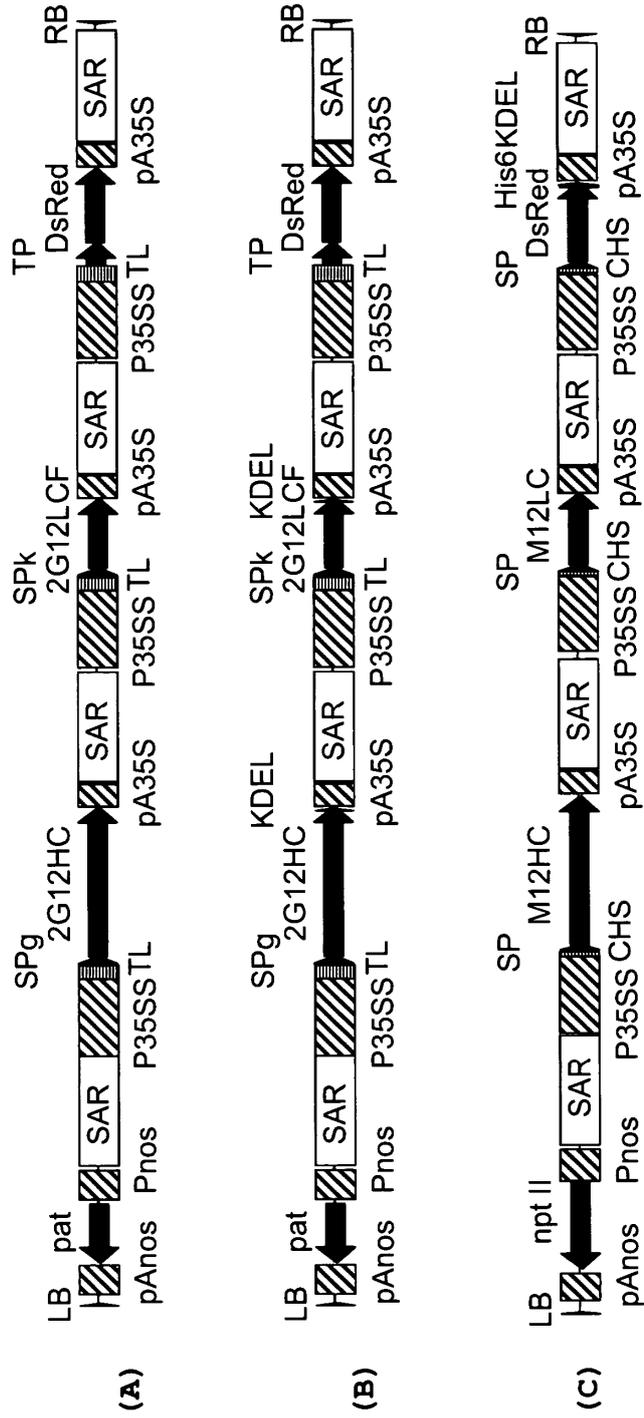


FIG. 3

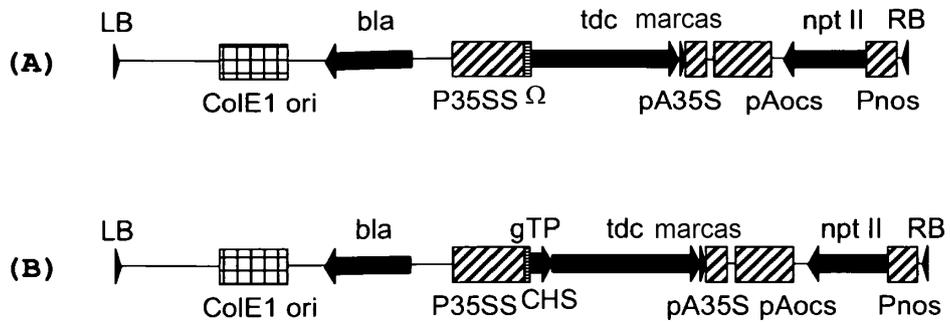


FIG. 4



FIG. 5

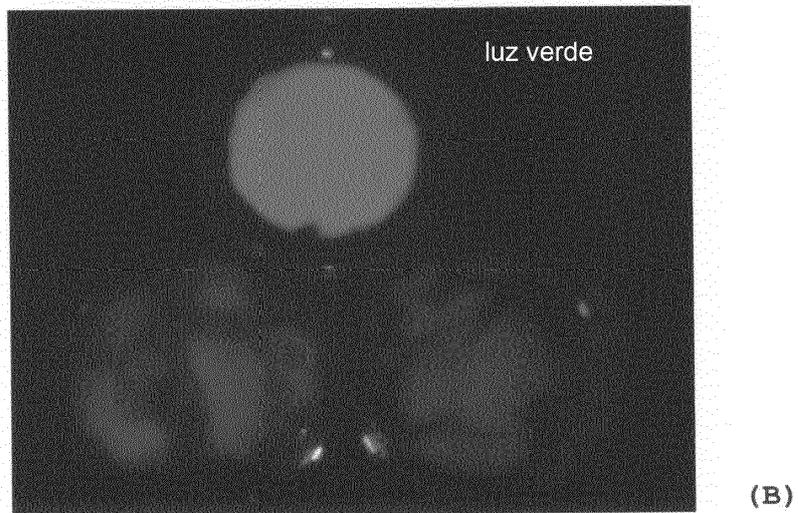
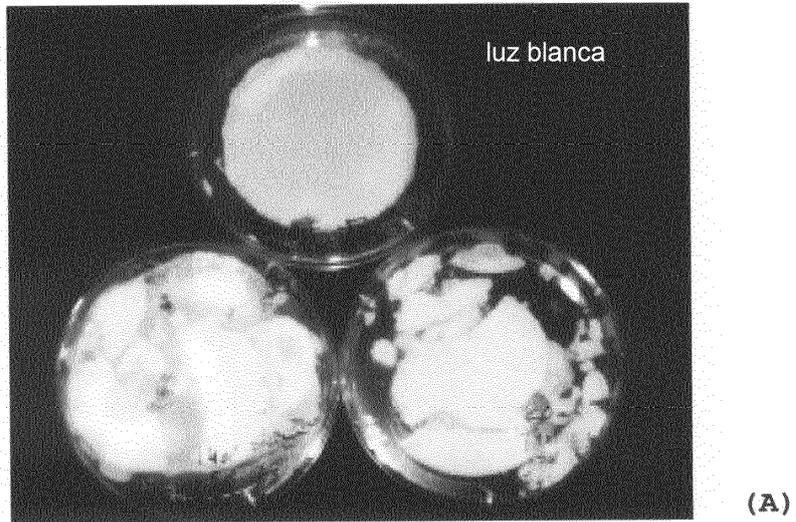
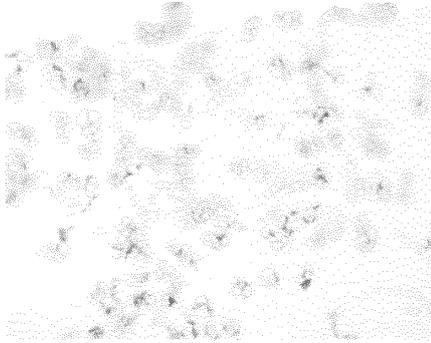
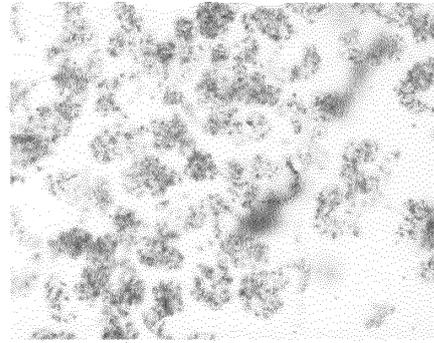


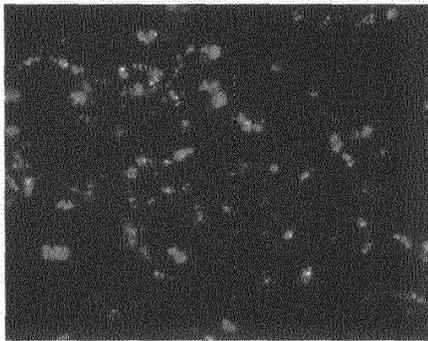
FIG. 6



(A)



(B)



(C)



(D)

FIG. 7

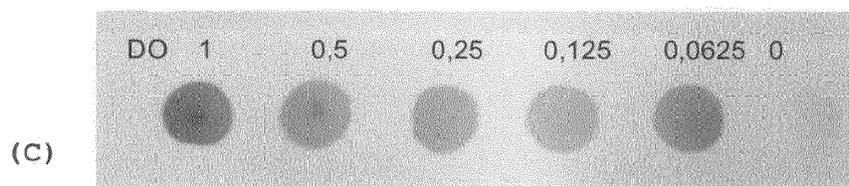
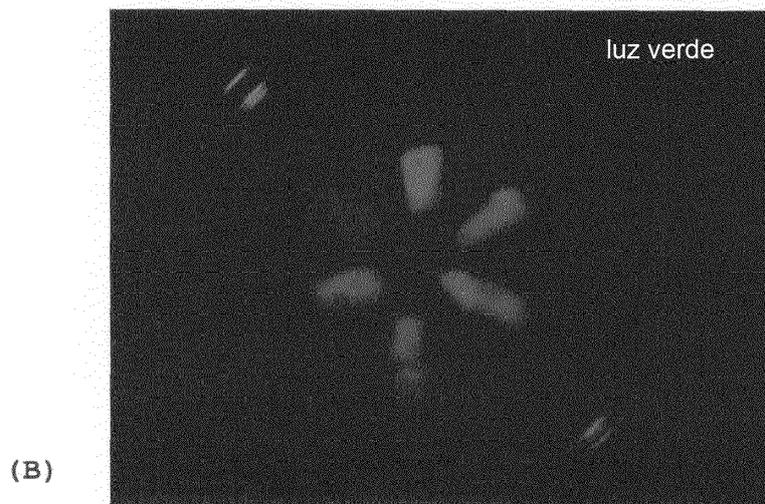
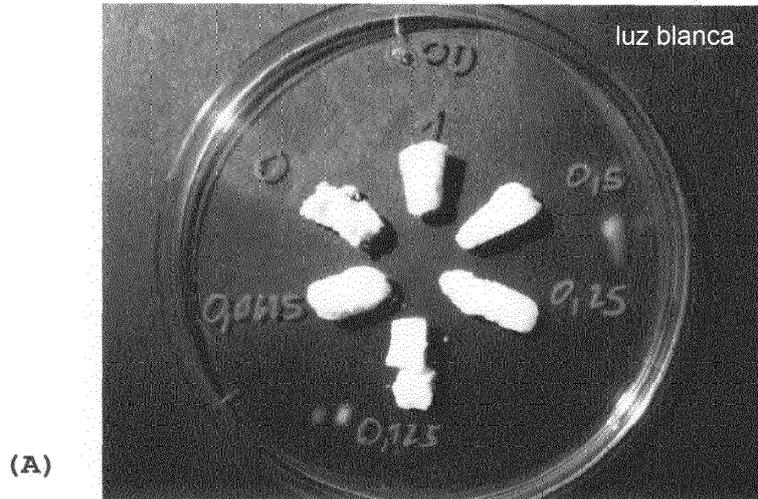


FIG. 8

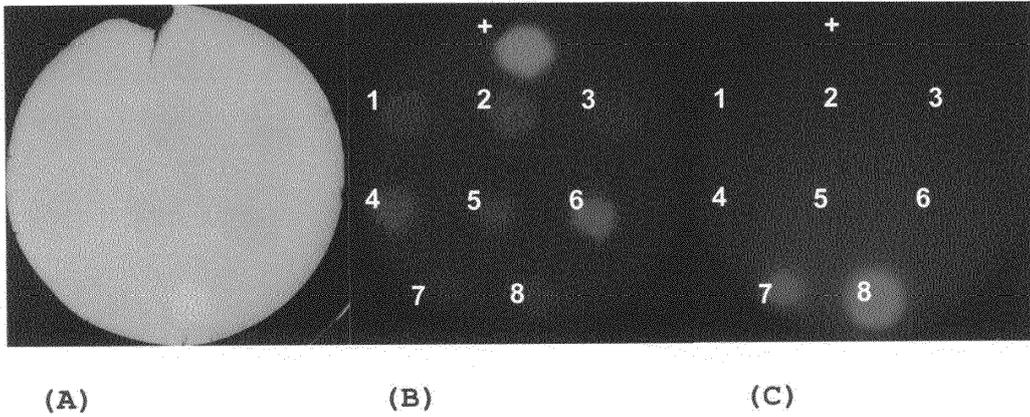


FIG. 9

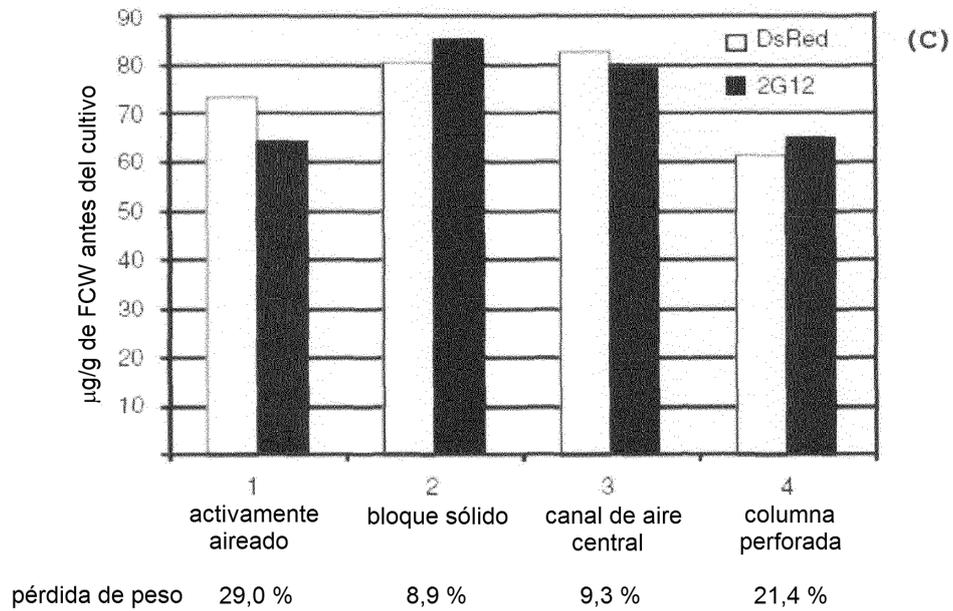
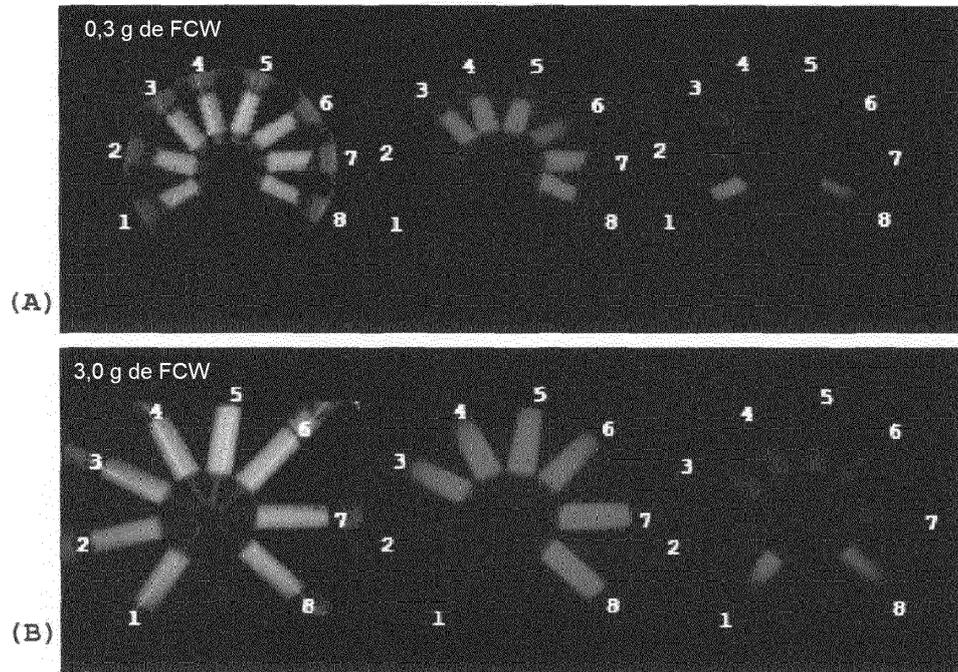


FIG. 10

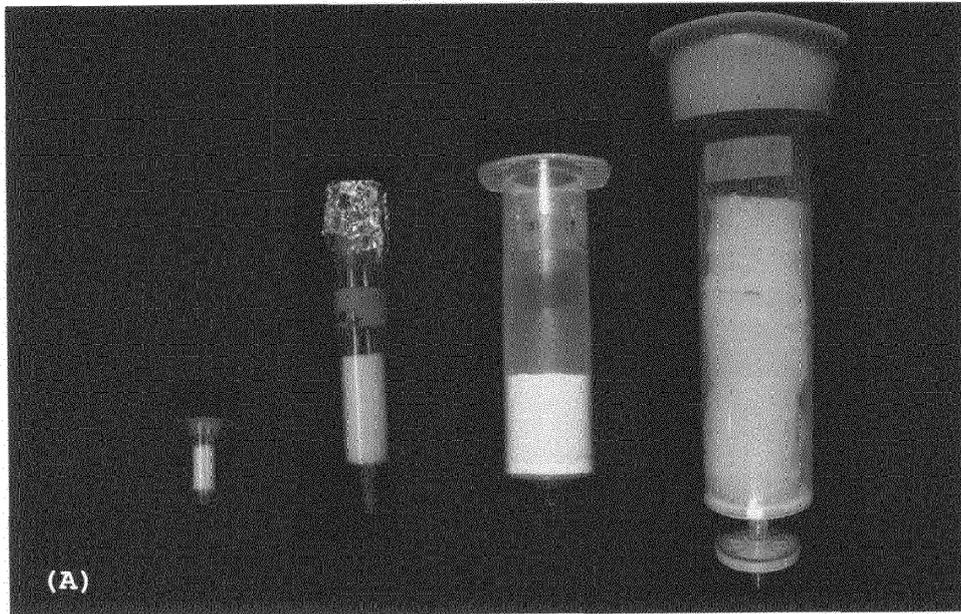


FIG. 11

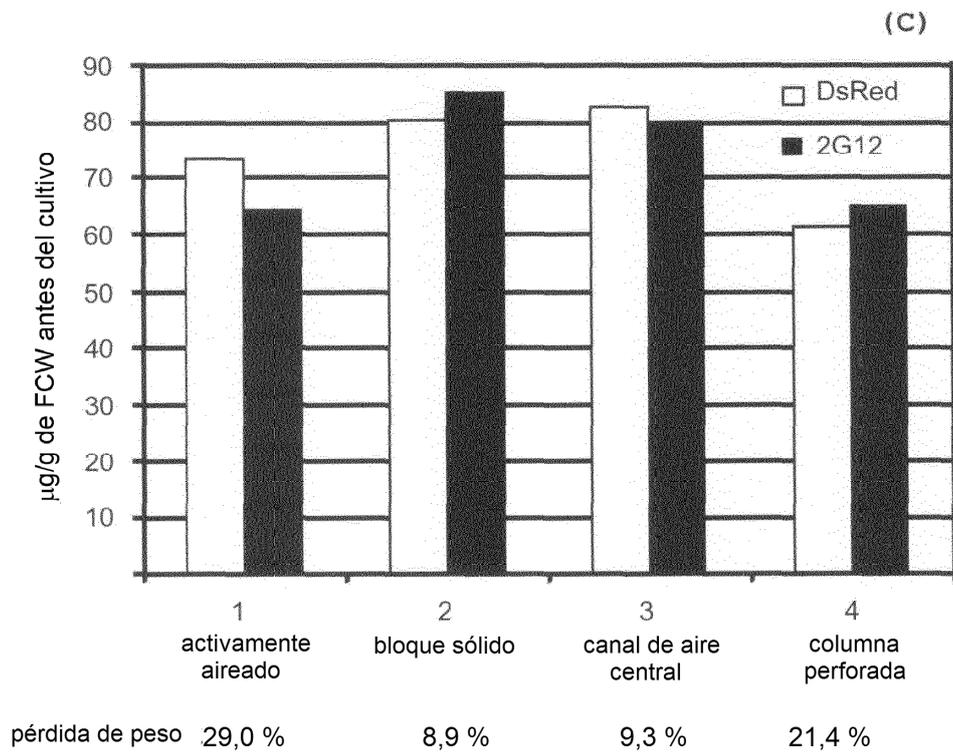
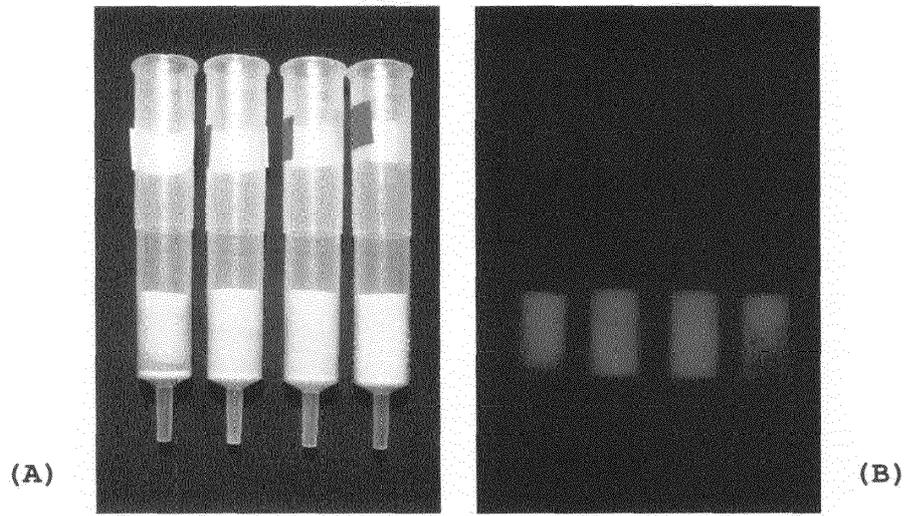


FIG. 12

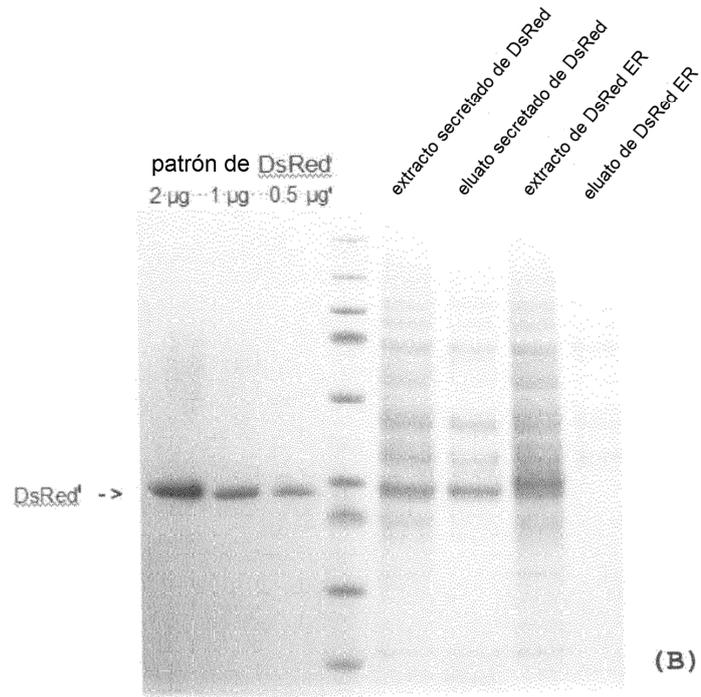
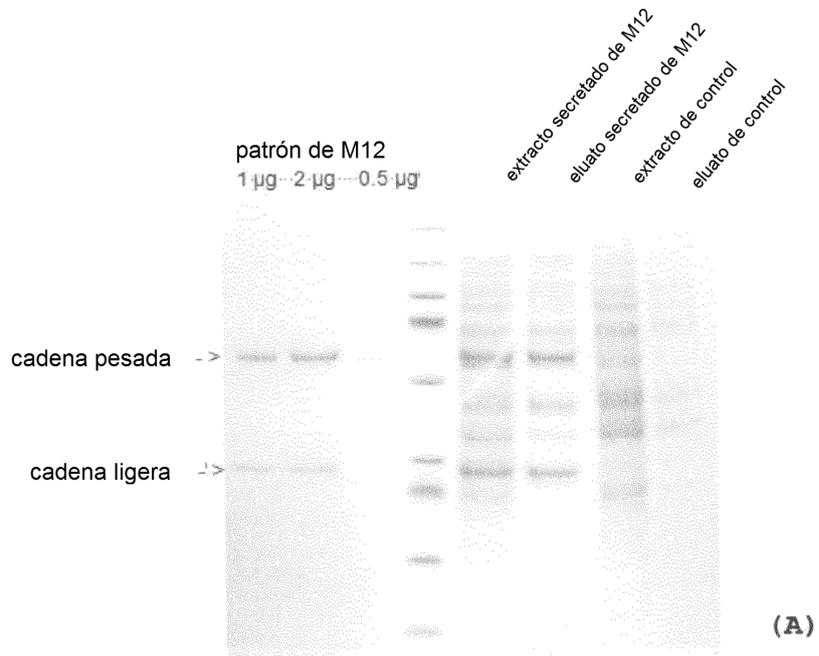


FIG. 13

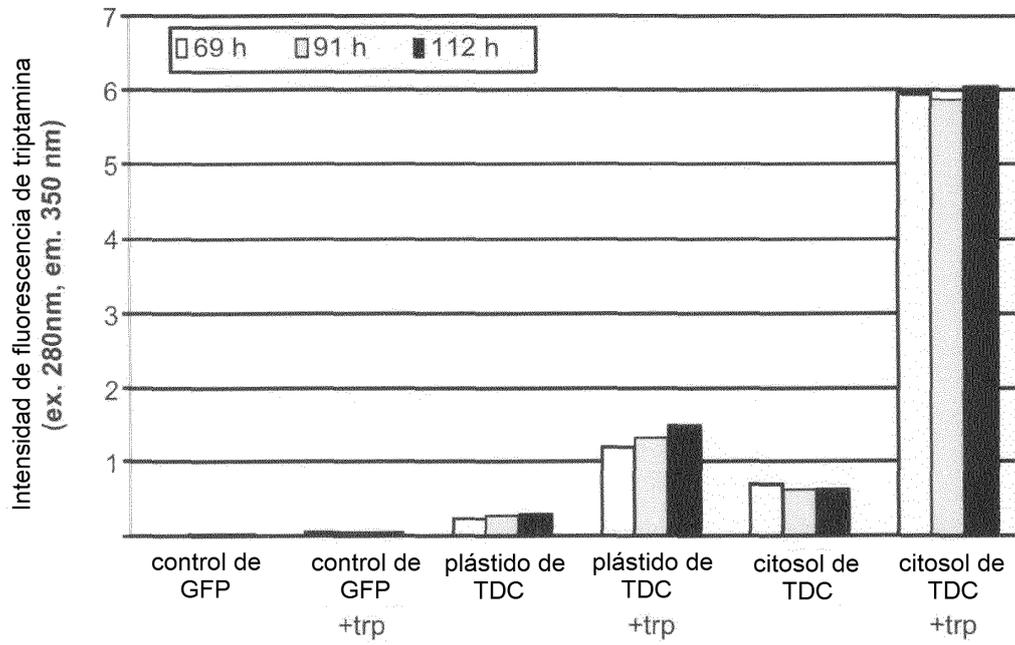


FIG. 14

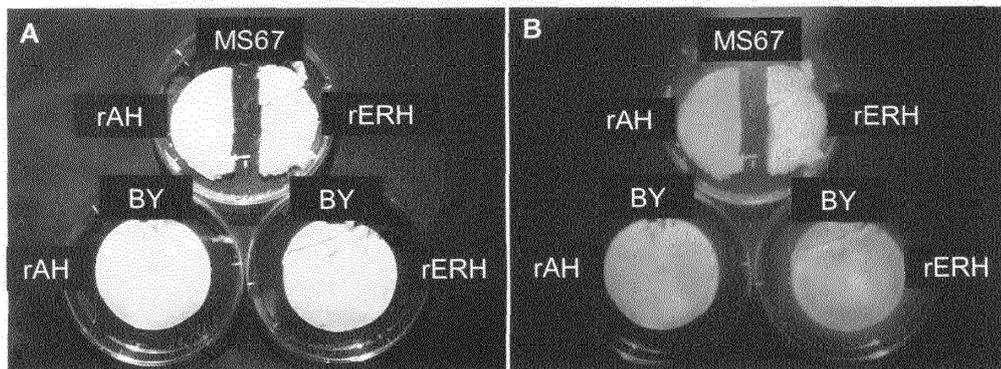


FIG. 15

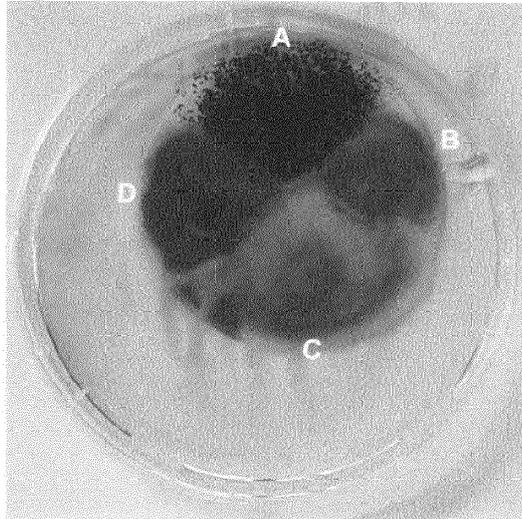


FIG. 16

