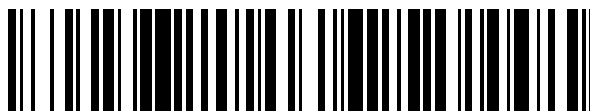


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 744**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2011 PCT/EP2011/064734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12025619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 11748954 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2609119**

54 Título: **Proteínas de unión al antígeno de polisacáridos quitinosos**

30 Prioridad:

07.09.2010 EP 10175543
26.08.2010 US 402307 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2017

73 Titular/es:

AGROSAVFE N.V. (100.0%)
Technologiepark 4
9052 Gent, BE

72 Inventor/es:

VERHEESEN, PETER;
DE JONGHE, CHRIS y
JONGEDIJK, ERIK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 646 744 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

Proteínas de unión al antígeno de polisacáridos quitinosos

La presente invención se refiere a una proteína de unión al antígeno derivada de un anticuerpo de camélido y que comprende una secuencia de VHH, donde dicha secuencia de VHH es capaz de unirse a un aminopolisacáridos, y a sus usos.

Antecedentes y técnica anterior

Los polisacáridos son estructuras de tipo carbohidrato polimérico, formadas por unidades repetidas de monosacáridos y unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos. Dependiendo de su composición química, los polisacáridos se dividen además en polisacáridos en el sentido estricto, que contienen únicamente grupos de hidroxilo y acetilo, y aminopolisacáridos, que contienen también nitrógeno (grupos amino o amido). Los aminopolisacáridos naturales incluyen la quitina y el quitosano (que contiene únicamente grupos hidroxilo, amino y acetilo) y queratinsulfato, ácido hialurónico, condroitina, dermatánsulfato y heparina, que contienen también grupos carboxilo y sulfato.

La quitina es el aminopolisacárido natural más abundante y está ampliamente distribuido entre los invertebrados, incluidos los artrópodos, nemátodos, crustáceos, hongos y algunos protozoos. La quitina es un polímero de la *N*-acetil-D-glucosamina. La forma principal de la quitina es la α -quitina, tal como se encuentra en los hongos y los artrópodos, y está caracterizada por una unión antiparalela de las cadenas polisacáridicas. La forma β , en la cual las cadenas se unen de una manera paralela, es bastante rara y se encuentra en las diatomeas y algunas protistas. El quitosano es el derivado *N*-desacetilado de la quitina, aunque esta *N*-desacetilación casi nunca es completa. La quitina y el quitosano corresponden a una familia de polímeros con un contenido variable de acetilo, donde el grado de acetilación determina si el aminopolisacárido se denomina quitina (grado de acetilación >70%) o quitosano (grado de acetilación <70%).

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y, junto con sus derivados, tiene aplicaciones en una amplia variedad de campos, incluidos el médico, farmacéutico, cosmético, en biotecnología, industria alimentaria, agricultura y protección medioambiental. A pesar de su enorme producción anual, la quitina sigue siendo una fuente de biomasa infrautilizada, principalmente debido a su intratable voluminosa estructura. Por lo tanto, resulta sumamente importante determinar la concentración de polisacáridos quitinosos, así como también identificar su estructura y posibles modificaciones, especialmente para un procesamiento industrial eficaz. Además, puede ser importante centrarse en polisacáridos quitinosos específicos, para eliminarlos de la matriz o para modificar su estructura.

Se ha prestado una especial atención a las proteínas de unión a la quitina para aplicaciones de detección y purificación. Las proteínas de unión a la quitina son bastante comunes y forman un grupo sumamente diverso que incluye, sin carácter limitante, las quitinasas que hidrolizan las uniones β -1,4-glucosídicas internas de la quitina. Se han detectado proteínas de unión a la quitina en bacterias (Folders *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2008), plantas (Iseli *et al.*, 1993), invertebrados (Suetake *et al.*, 2000) y vertebrados (Boot *et al.*, 1995). Las proteínas de unión a la quitina se caracterizan por tener uno o más dominios de unión a la quitina; estos dominios de unión pueden o no estar unidos a un dominio catalítico. Los dominios de unión se pueden aislar y fusionar con otros polipéptidos para crear proteínas de unión a la quitina novedosas.

Los dominios de unión a la quitina y las proteínas de unión a la quitina tienen múltiples aplicaciones posibles: ya que la quitina está ausente en los vertebrados y las plantas, se pueden utilizar los dominios de unión a la quitina para detectar la infección o contaminación por parte de organismos que contienen quitina, tal como se divulga en los documentos WO9217786 o WO2005005955. Si se fusiona un dominio de unión a la quitina con una proteína de interés, dicha proteína de interés se puede purificar en un portador de quitina utilizando cromatografía de afinidad. Además, en el documento WO9411511 se divulgan las proteínas de unión a la quitina biocidas que ejercen una actividad antifúngica y que se pueden utilizar como agentes antimicrobianos. Joshi *et al.* (2008) describen una proteína de unión a la quitina con actividad insecticida. En el documento WO2004031379 se divulgan proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión a carbohidratos capaz de unirse a la celulosa o la quitina, fusionado con un segundo dominio de unión, que puede derivarse de un anticuerpo de camélido.

Sin embargo, a pesar de su posible valor, el uso de los dominios de unión a la quitina y las proteínas de unión a la quitina es bastante limitado debido a varios inconvenientes. La mayoría de los dominios de unión a la quitina muestran reactividad cruzada con otros polisacáridos, lo que limita el valor del dominio de unión para la detección específica de la quitina (Itoh *et al.*, 2002; Guillen *et al.*, 2010). Varios dominios de unión a la quitina se unen a la quitina con una afinidad bastante baja (Neeraja *et al.*, 2010b), lo que limita las aplicaciones en todos los campos. Además, los dominios de unión a la quitina pueden unirse a la quitina de una manera irreversible (Xu *et al.*, 2000; WO03074660), lo que complica el uso en la purificación por afinidad, debido a que la proteína no se puede eluir en condiciones no desnaturizantes.

Para resolver los problemas, se ha propuesto la introducción de mutaciones en los dominios de unión a la quitina para modular la actividad de unión a la quitina y para crear dominios de unión a la quitina modificados con

propiedades de unión reversibles (Ferrandon *et al.*, 2003; WO03074660). Sin embargo, aún se necesitan mejores proteínas de unión a la quitina.

Se sabe que los anticuerpos poseen una elevada afinidad y especificidad. Sin embargo, la producción de anticuerpos contra los polisacáridos dista de ser evidente, ya que los polisacáridos son apenas inmunógenos. Se han detectado anticuerpos de tipo IgA contra la quitina en el suero de la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad intestinal inflamatoria (WO2009069007; Dotan *et al.*, 2006; Seow *et al.*, 2008; Seow *et al.*, 2009) y después de una infección por *Candida albicans* (Sendid *et al.*, 2008). Sales *et al.* (2001) y Martin *et al.* (2007) describen la generación de anticuerpos policlonales de conejo contra la quitina; en el documento US5004699 se divulga el uso de un suero de ratón que contiene anticuerpos policlonales contra la quitina para detectar hongos y levaduras. Siham Agdour (2007) describe la generación de anticuerpos monoclonales contra la quitina y el quitosano. Secondino *et al.* (2005) divulga un anticuerpo monoclonal contra la quitina para inmunomarcarse insectos. Sin embargo, para los usos previstos, se necesitan anticuerpos monoclonales y, de manera preferente, anticuerpos monocatenarios. En la técnica no se han divulgado anticuerpos monocatenarios contra la quitina.

En el documento WO94004678 se describen inmunoglobulinas desprovistas de las cadenas ligeras. Está demostrado que tales proteínas de unión al antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de armazón (FR, por sus siglas en inglés) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) y, de manera más específica VHH, muestran unas características superiores respecto a los anticuerpos monoclonales ya que son sumamente estables y mantienen la capacidad de unión al antígeno diana a una temperatura elevada (van der Linden *et al.*, 1999) o en condiciones desnaturizantes (Dolk *et al.*, 2005) y son resistentes a condiciones regeneradoras duras (Saerens *et al.*, 2005). Por lo tanto, dichas proteínas de unión al antígeno son especialmente idóneas para su uso en los procesos industriales. Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito tales proteínas de unión al antígeno capaces de unirse a los polisacáridos, aunque se ha intentado obtener tales anticuerpos. De hecho, en el documento WO94004678 se divulgaron anticuerpos de camélido contra carbohidratos, pero estos se dirigen contra la variante del antígeno superficial de *Trypanosoma evansi*, que es una glucoproteína. En el documento WO94004678 ni se divulgan ni se sugieren anticuerpos contra polisacáridos en el sentido estricto o contra aminopolisacáridos. Además, cuando De Simone *et al.* (2008) analizan la respuesta inmunitaria en llamas inmunizadas con diferentes tipos de antígenos, es decir, proteína, hapteno conjugado o polisacárido (dextran sulfato), no se pudo detectar ninguna respuesta inmunitaria contra el dextrano en los animales inmunizados, a diferencia de las evidentes respuestas inmunitarias a los antígenos de la proteína y del hapteno conjugado; si bien resulta relativamente fácil generar anticuerpos clásicos contra el dextrano (Cisar *et al.*, 1975; Bona 1993). La ausencia de una respuesta en forma de anticuerpos en las inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras no es inesperada: de hecho las respuestas contra los polisacáridos en los seres humanos están claramente dominadas por los tipos IgM e IgG1 (Bona, 1993) mientras que los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos pertenecen a las clases IgG2 e IgG3 (Hamers-Casterman *et al.*, 1993; Daley *et al.*, 2010). Además, existe constancia de que las interacciones entre los polisacáridos y los sitios de unión individuales en una proteína son normalmente débiles y la potencia y especificidad de unión se ven potenciada gracias a las interacciones poliméricas entre los polisacáridos y las proteínas de unión a polisacáridos oligoméricos (Mammen *et al.*, 1998). Siendo de manera intrínseca elementos de unión estrictamente monoméricos (Muyldermans *et al.*, 2001), los VHH no son adecuados en este sentido para unirse a los polisacáridos. Por lo tanto, el experto en la técnica asumiría que es extremadamente difícil, si no imposible, generar inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras contra polisacáridos quitinosos. Otro factor problemático es la baja solubilidad en agua de los polisacáridos quitinosos, especialmente la quitina, lo que significa que muchas técnicas estándar utilizadas para aislar anticuerpos que se llevan a cabo en solución acuosa, no se pueden aplicar.

Para obtener y aislar proteínas de unión al antígeno específicas para los polisacáridos quitinosos, se utilizó una estrategia original e innovadora. Al inmunizar llamas con una mezcla compleja que contiene polisacáridos quitinosos, en vez de con un antígeno purificado, seleccionar después proteínas de unión al antígeno utilizando quitina solubilizada inmovilizada y cribar finalmente con quitina, preparada directamente en una superficie sólida, los autores fueron capaces de aislar proteínas de unión al antígeno, de manera más específica proteínas de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de armazón (FR) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR), donde dichas proteínas de unión al antígeno son capaces de unirse a los polisacáridos quitinosos. Preferentemente, dichas proteínas de unión al antígeno se unen a la quitina.

La presente invención proporciona una proteína de unión al antígeno derivada de un anticuerpo de camélido y que comprende una secuencia de VHH, donde dicha secuencia de VHH es capaz de unirse a un aminopolisacárido. En una realización preferida, el aminopolisacárido es quitina o quitosano. En otra realización preferida, la proteína de unión al antígeno tiene actividad insecticida o antifúngica. En otra realización preferida, la proteína de unión al antígeno comprende una secuencia seleccionada partir del grupo constituido por las SEQ ID N° 1 – SEQ ID N° 4.

En la invención también se proporciona el uso de una proteína de unión al antígeno de la invención para determinar la presencia y/o concentración de un aminopolisacárido en una muestra.

En la invención también se proporciona el uso de una proteína de unión al antígeno de la invención para aislar o purificar un aminopolisacárido en una muestra.

En la invención también se proporciona un agente de direccionamiento, capaz de unir un compuesto a un aminopolisacárido, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno de la invención.

También se proporciona en la invención el uso de un agente de direccionamiento de la invención para dirigir un compuesto a un aminopolisacárido.

- 5 Además, en la invención se proporciona una composición que comprende (i) al menos un agente de direccionamiento de la invención y (ii) uno o más compuestos. En una realización preferida, la composición es una composición agroquímica.

10 En la invención también se proporciona un método para mejorar la resistencia de una planta contra plagas de insectos y/o enfermedades fúngicas, comprendiendo dicho método al menos una aplicación de una composición de la invención a la planta o a partes de la planta.

En la invención también se proporciona una planta, transformada con un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, que codifica una proteína de unión al antígeno de la invención.

Descripción detallada de la invención

15 En la presente se describe una proteína de unión al antígeno derivada de un anticuerpo de camélido y que comprende una secuencia de VHH, donde dicha secuencia de VHH es capaz de unirse a un aminopolisacárido.

20 La expresión «proteína de unión al antígeno», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la totalidad o parte de una molécula proteínica (proteína, similar a proteínas o que contiene proteínas) que es capaz de unirse utilizando interacciones intermoleculares específicas a una molécula diana. Una proteína de unión al antígeno puede ser una molécula de origen natural, se puede derivar de una molécula de origen natural o puede tener un diseño totalmente artificial. Una proteína de unión al antígeno puede estar basada en inmunoglobulinas o puede estar basada en dominios presentes en proteínas que incluyen, sin carácter limitante, proteínas microbianas, inhibidores de proteasas, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas superenrolladas antiparalelas monocatenarias o proteínas con motivos repetidos. Los ejemplos no limitantes de tales proteínas de unión al antígeno son las proteínas de unión al antígeno de carbohidratos (CBD) (Blake et al, 2006), anticuerpos de cadena pesada (hcAb), anticuerpos monocatenarios (sdAb), minicuerpos (Tramontano *et al.*, 1994), el dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH), el dominio variable de los nuevos receptores antigénicos (VNAR), anticuerpos (Nygren, 2008), alfacuerpos (WO2010066740), dominios repetidos de anquirina diseñados (DARPin) (Stumpp *et al.*, 2008), anticualinas (Skerra, 2008), knottinas (Kolmar, 2008) y dominios de CH2 modificados (nanoanticuerpos; Dimitrov, 2009).

30 Los «polisacáridos», tal como se utilizan en la presente, son estructuras de carbohidratos poliméricos, formados por unidades repetidas de monosacáridos, unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos, incluidos los aminopolisacáridos, y sus derivados. Los «aminopolisacáridos», tal como se utilizan en la presente, se refieren a polisacáridos que contienen nitrógeno (grupos amido o amino) pero excluye los polisacáridos que además contienen grupos carboxilo o sulfato. Preferentemente, dichos polisacáridos no están contaminados por otros compuestos no polisacáridos y tiene una pureza de al menos un 85% p/p, preferentemente un 90% p/p, más preferentemente un 95% p/p, aún más preferentemente un 98% p/p y de la manera más preferida un 99% p/p. Los polisacáridos se distinguen de los oligosacáridos en su tamaño, complejidad y grado de polimerización. Los polisacáridos, tal como se utilizan en la presente, comprenden al menos 10 unidades monosacáridicas, preferentemente al menos 15 unidades monosacáridicas.

40 La expresión «polisacáridos quitinosos», tal como se utiliza en la presente, se refiere a los aminopolisacáridos y sus derivados o modificaciones, que incluyen, sin carácter limitante, la nitración, fosforilación, sulfatación, acilación, desacetilación, hidroxialquilación, alquilación y/o copolimerización de injerto. Preferentemente, dicho polisacárido quitinoso es un aminopolisacárido natural.

45 La expresión «capaz de unirse a un polisacárido quitinoso», tal como se utiliza en la presente, significa que la proteína de unión al antígeno puede formar un complejo estable con un polisacárido quitinoso, preferentemente un polisacárido quitinoso insoluble, donde se puede evaluar la eficacia de la unión precipitando el complejo del polisacárido quitinoso/proteína de manera similar a la descrita por Folders *et al.* (2000). Como alternativa, los polisacáridos quitinosos se pueden inmovilizar sobre un portador insoluble que permita capturar la proteína de unión al antígeno y evaluar la unión.

50 Preferentemente, las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente son proteínas de unión al antígeno monoclonales. Una «proteína de unión al antígeno monoclonal», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína de unión al antígeno producida por un único clon de células y, por lo tanto, un único tipo puro y homogéneo de la proteína de unión al antígeno. Más preferentemente, las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente están constituidas por una única cadena polipeptídica. De la manera más preferida, las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de armazón y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de estas, y confieren su especificidad de unión al polisacárido quitinoso mediante la secuencia de aminoácidos de 3 regiones

determinantes de la complementariedad o CDR, donde cada una de ellas no es contigua a las otras (denominadas CDR1, CDR2, CDR3), que están intercaladas entre las 4 regiones de armazón o FR, donde cada una de ellas no es contigua a las otras (denominadas FR1, FR2, FR3, FR4), preferentemente en una secuencia FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4). La delineación de las secuencias FR y CDR se basan en el sistema de numeración único según Kabat. El experto en la técnica está familiarizado con dichas proteínas de unión al antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones de armazón y 3 regiones determinantes de la complementariedad y estas se han descrito, como un ejemplo no limitante, en Wesolowski *et al.* (2009). La longitud del bucle de CDR3 es sumamente variable y puede variar entre 0, preferentemente 1, y más de 20 residuos aminoacídicos, preferentemente hasta 25 residuos aminoacídicos.

Preferentemente, resulta fácil producir dicha proteína de unión al antígeno descrita en la presente con un rendimiento elevado, preferentemente en un sistema de expresión recombinante microbiano, y resulta conveniente aislarla y/o purificarla posteriormente. También preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es estable, tanto durante el almacenamiento como durante la utilización, lo que significa que la integridad de la proteína de unión al antígeno se mantiene en el almacenamiento y/o en las condiciones de utilización, que pueden incluir temperaturas elevadas, ciclos de congelación-descongelación, cambios en el pH o en la fuerza iónica, irradiación de UV, presencia de agentes químicos dañinos y similares. Más preferentemente, dicha proteína de unión al antígeno es estable en una formulación agroquímica tal como se define más adelante. De la manera más preferida, dicha proteína de unión a antígeno sigue siendo estable en una formulación agroquímica (tal como se define más adelante) cuando se almacena a la temperatura ambiente durante un periodo de hasta dos años o cuando se almacena a 54 °C durante un periodo de al menos dos semanas.

La unión de la proteína de unión al antígeno a un polisacárido quitinoso se produce preferentemente con una afinidad elevada: normalmente, la constante de disociación de la unión entre la proteína de unión al antígeno y la molécula diana polisacáridica quitinosa es inferior a 10^{-5} M, más preferentemente, la constante de disociación es inferior a 10^{-6} M, aún más preferentemente, la constante de disociación es inferior a 10^{-7} M, de la manera más preferida, la constante de disociación es inferior a 10^{-8} M. Preferentemente, la unión de la proteína de unión al antígeno al polisacárido quitinoso es específica, lo que significa que la proteína de unión al antígeno se une de manera preferente a un polisacárido quitinoso que está presente en una mezcla homogénea o heterogénea de diferentes polisacáridos u otros compuestos. La especificidad de unión de una proteína de unión al antígeno se puede analizar mediante métodos tales como el ELISA, tal como se describe en el ejemplo 3, en el cual se compara la unión de la proteína de unión al antígeno a su molécula diana con la unión de la proteína de unión al antígeno a una molécula no relacionada y con una adherencia específica de la proteína de unión al antígeno al recipiente de reacción. En ciertas realizaciones, una interacción de unión específica discriminada entre antígenos deseables y no deseables en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 o 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10 000 veces). Preferentemente, la unión a su molécula diana de la proteína de unión al antígeno sigue siendo funcional en condiciones duras, tales como una temperatura baja o elevada, pH bajo elevado, fuerza iónica baja o elevada, irradiación UV, presencia de agentes químicos desnaturalizantes o similares. En una realización preferida, dichas condiciones duras se definen mediante un intervalo de pH de 4 a 9, más preferentemente mediante un intervalo de pH de 3 a 10, aún más preferentemente mediante un intervalo de pH de 2 a 10, de la manera más preferida mediante un intervalo de pH de 1 a 11. En otra realización preferida, dichas condiciones duras se definen mediante un intervalo de temperatura de 4-50 °C, más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-55 °C, aún más preferentemente un intervalo de temperatura de 0-60 °C. En otra realización preferida más, dichas condiciones duras se definen como las condiciones predominantes en una formulación agroquímica tal como se definen más adelante.

En una realización preferida, el polisacárido quitinoso es la quitina. La «quitina», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un aminopolisacárido natural constituido por una cadena larga de *N*-acetilglucosamina, con un grado de desacetilación inferior a un 70%. Es el componente principal de las paredes celulares de los hongos y también está presente en las cicatrices en las células madre (*bud scars*) de las levaduras *Saccharomyces*, así como también los exoesqueletos de artrópodos tales como los crustáceos (por ejemplo, cangrejos, bogavante y gambas) e insectos.

En una realización preferida, dicho polisacárido quitinoso, preferentemente dicha quitina, está comprendida en una superficie sólida, tal como una microesfera paramagnética con quitina o inmovilizada sobre una superficie sólida, tal como quitina solubilizada que está inmovilizada sobre una placa multipocillo inmunosorbente, a modo de ejemplos no limitantes.

En otra realización preferida, dicho polisacárido quitinoso, preferentemente dicha quitina, está comprendida en un artrópodo, preferentemente un insecto, o se deriva de este. La expresión «comprendido en», tal como se utiliza en la presente, significa que está contenido, ubicado o dentro de un artrópodo, preferentemente un insecto, o cualquier parte o estructura concreta de este, tal como el intestino de un insecto, a modo de ejemplo no limitante; la expresión «derivado de», tal como se utiliza en la presente, significa preparado, producido o aislado a partir de un artrópodo, preferentemente un insecto, o cualquier parte o estructura concreta de este, tal como la concha de un cangrejo o el exoesqueleto de un insecto, a modo de ejemplos no limitantes. Preferentemente, dicho insecto se considera un insecto que es una plaga. La expresión «un insecto que es una plaga», tal como se utiliza en la presente, es un insecto que es nocivo para los seres humanos o para los intereses humanos e incluye, sin carácter limitante, los organismos que son plagas agrícolas que incluyen, sin carácter limitante, los áfidos, saltamontes, orugas,

escarabajos, etc., organismos que son plagas domésticas tales como las cucarachas, hormigas, etc., y vectores de enfermedades tales como los mosquitos de la malaria.

En otra realización preferida más, dicho polisacárido quitinoso, preferentemente dicha quitina, está comprendida o se deriva de un hongo incluidos, sin carácter limitante, las levaduras y hongos filamentosos. La expresión «comprendido en», tal como se utiliza en la presente, significa que está contenido, ubicado o dentro de un hongo o una levadura, o cualquier parte o estructura concreta de estos, tal como las hifas de los hongos o las cicatrices de las células madre, a modo de ejemplo no limitante; la expresión «derivado de», tal como se utiliza en la presente, significa preparado, producido o aislado a partir de un hongo o una levadura, o cualquier parte o estructura concreta de estos, tal como las esporas de un hongo o la pared celular de una levadura, a modo de ejemplos no limitantes. Preferentemente, dicho hongo se considera un organismo que produce una enfermedad fúngica. Un «organismo que produce la enfermedad fúngica», tal como se utiliza en la presente, es un organismo fúngico que es nocivo para los seres humanos o los intereses humanos e incluye, sin carácter limitante, las enfermedades fúngicas agrícolas incluidas, sin carácter limitante, los marchitamientos, carbones, mohos, etc., y las enfermedades fúngicas de animales y seres humanos incluidas, sin carácter limitante, las infecciones por *Candida albicans*.

En otra realización preferida diferente, la proteína de unión al antígeno que se une a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, tiene actividad insecticida. La expresión «actividad insecticida», tal como se utiliza en la presente, significa que la proteína de unión al antígeno es capaz de destruir al insecto, preferentemente el insecto que es una plaga, o es capaz de ralentizar o inhibir el crecimiento, la reproducción y/o la actividad nociva (tal como la alimentación en un cultivo) del insecto, preferentemente el insecto que es una plaga. La actividad insecticida de una proteína de unión al antígeno descrito en la presente se puede determinar alimentando al insecto con la proteína de unión al antígeno descrito en la presente y monitorizando la supervivencia del insecto, la tasa de reproducción y/o el resultado de la actividad nociva (tal como la cantidad de hojas del cultivo que come el insecto). A modo de ejemplo no limitante, la proteína de unión al antígeno descrita en la presente puede interferir con el sistema digestivo del insecto uniéndose al recubrimiento con quitina del intestino del insecto y, por lo tanto, reducir o dañar completamente la alimentación del insecto, lo que en última estancia conllevará la inanición.

En otra realización preferida más, la proteína de unión al antígeno que se une a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, tiene actividad fungicida. La expresión «actividad fungicida», tal como se utiliza en la presente, significa que la proteína de unión al antígeno es capaz de inhibir parcial o totalmente el crecimiento de un hongo o de destruir el hongo, preferentemente el organismo que causa la enfermedad fúngica, tal como se ha descrito anteriormente. La actividad fungicida de una proteína de unión al antígeno descrito en la presente se puede determinar añadiendo la proteína de unión al antígeno descrita en la presente al medio de cultivo de un hongo o levadura y monitorizando las tasas de crecimiento y supervivencia fúngicas, utilizando cualquiera de los métodos descritos en el documento WO9411511.

Dichas proteínas de unión al antígeno descritas en la presente se derivan de los anticuerpos de camélido de cadena pesada, desprovistos de cadenas ligeras, tales como los dominios variables de los anticuerpos de camélido de cadena pesada (VHH). Preferentemente, dicho VHH comprende, está constituido preferentemente por una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID N° 1 – SEQ ID N° 4 o sus homólogos. Los homólogos, tal como se utilizan en la presente, son secuencias donde cada región de armazón y cada región determinante de la complementariedad muestra al menos un 80% de identidad, preferentemente al menos un 85% de identidad, más preferentemente al menos un 90% de identidad, aún más preferentemente un 95% de identidad con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir, el homólogo de FR1 respecto a la FR1 de referencia, el homólogo de CDR1 respecto a la CDR1 de referencia, FR2h respecto a FR2r, CDR2h respecto a CDR2r, FR3h respecto a FR3r, CDR3h respecto a CDR3r y FR4h respecto a FR4r) tal como se mide en una alineación BLASTp (Altschul *et al.*, 1997; definiciones de FR y CDR según Kabat).

En otra realización más, una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de unión al antígeno anteriores o sus fragmentos funcionales también es parte de la presente divulgación. La divulgación también engloba el uso de cualquier proteína de unión al antígeno descrita en la presente para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión específica a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, para construir dominios de unión artificiales basados en dichas secuencias de aminoácidos. Ciertamente, en las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente, las regiones de armazón y las regiones determinantes de la complementariedad son conocidas y el estudio de los derivados de las proteínas de unión al antígeno, que se unen al mismo polisacárido quitinoso, permitirá deducir los aminoácidos esenciales que participan en la unión al polisacárido quitinoso. Este conocimiento se puede utilizar para construir una proteína de unión al antígeno mínima y para crear sus derivados.

Además, la presente divulgación también contempla vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas de unión al antígeno anteriores o sus fragmentos funcionales, así como también células hospedadoras que expresan tales vectores de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen los sistemas de expresión constitutivos e inducibles de bacterias o levaduras, sistemas de expresión de virus, tales como los baculovirus, el virus del bosque Semliki, o la transfección transitoria de células de insectos o de mamíferos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y similares. Los animales hospedadores adecuados

incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40 y similares. La clonación, expresión y/o purificación de las proteínas de unión al antígeno se puede realizar de acuerdo con las técnicas que conoce el experto en la técnica. En consecuencia, la divulgación engloba métodos de producción de proteínas de unión al antígeno descritas en la presente, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 5 (i) clonar las secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente o sus fragmentos funcionales en vectores de expresión adecuados, y
- (ii) expresar las proteínas de unión a antígeno en un hospedador de expresión adecuado; y
- (iii) aislar y/o purificar las proteínas de unión al antígeno a partir del lisado o sobrenadante del hospedador de expresión.

10 Aunque las colecciones no expuestas al antígeno o sintéticas de VHH (para consultar ejemplos de tales colecciones remítase a los documentos WO9937681, WO0043507, WO0190190, WO03025020 y WO03035694) pueden contener elementos de unión a los polisacáridos quitinosos adecuados, una realización preferida de esta divulgación incluye la inmunización de un individuo de una especie de *Camelidae* con uno o una combinación de varios polisacáridos quitinosos, para exponer al sistema inmunitario del animal a los polisacáridos quitinosos. Por lo tanto, como se describe en la presente más adelante, tales secuencias de VHH se pueden generar u obtener preferentemente inmunizando de manera adecuada una especie de *Camelidae* con uno o una combinación de varios polisacáridos quitinosos, obteniendo una muestra biológica adecuada a partir de dicha especie de *Camelidae* (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de linfocitos B) y generando secuencias de VHH dirigidas contra el polisacárido quitinoso deseado a partir de dicha muestra. Tales técnicas serán evidentes para el experto.

15 Otra técnica más para obtener las secuencias de VHH deseadas conlleva inmunizar de manera adecuada a un mamífero transgénico que sea capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, de manera que induzca una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra un polisacárido quitinoso), obtener una muestra biológica adecuada a partir de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de linfocitos B) y generar a continuación secuencias de VHH dirigidas contra dicho polisacárido quitinoso

20 partir de dicha muestra, utilizando cualquier técnica adecuada conocida de por sí. Por ejemplo, a este efecto, se pueden utilizar los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en los documentos WO02085945 y WO04049794.

En consecuencia, la divulgación engloba métodos para generar proteínas de unión al antígeno descritas en la presente. A modo de ejemplo no limitante, se proporciona un método para generar proteínas de unión al antígeno que se unen de manera específica a los polisacáridos quitinosos, preferentemente a la quitina, que comprende

- 30 (i) inmunizar a un animal con una mezcla compleja que contiene polisacáridos quitinosos, y
- (ii) seleccionar proteínas de unión al antígeno que se unen a la quitina solubilizada inmovilizada sobre una superficie sólida; y
- (iii) cribar para identificar proteínas de unión al antígeno que se unen de manera específica a la quitina preparada sobre un portador insoluble.

El cribado para identificar las proteínas de unión al antígeno, a modo de ejemplo no limitante, que se unen de manera específica a un polisacárido quitinoso se puede llevar a cabo, por ejemplo, cribando un conjunto, agrupación o colección de células que expresan los anticuerpos de cadena pesada en su superficie (por ejemplo, linfocitos B obtenidos de un camélido inmunizado de manera adecuada) o bacteriofagos que muestran una fusión del gen III y VHH en su superficie, cribando una colección (no expuesta al antígeno o inmunitaria) de secuencias de VHH o cribando una colección (no expuesta al antígeno o inmunitaria) de secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de VHH, todos los cuales se pueden llevar a cabo de una manera conocida de por sí, y el método puede comprender además de manera opcional una o más etapas adicionales, tales como, por ejemplo, y sin carácter limitante, una etapa de maduración de la afinidad, una etapa de expresión de la secuencia de aminoácidos deseada, una etapa de cribado para identificar la unión y/o actividad contra el polisacárido quitinoso deseado, una etapa de determinación de la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos deseada, una etapa de introducción de una o más sustituciones de ácidos nucleicos, una etapa de formateo en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, una etapa de cribado para seleccionar las propiedades biológicas y fisiológicas deseadas (es decir, utilizando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica) y/o cualquier combinación de una o más de

40

45

50

En la presente también se divulga el uso de una proteína de unión al antígeno descrita en la presente para determinar la presencia y/o concentración de un polisacárido quitinoso en una muestra.

El experto en la técnica está familiarizado con los métodos para determinar la presencia y/o concentración de un compuesto utilizando proteínas de unión al antígeno y éstos incluyen, sin carácter limitante, la inmunoprecipitación, inmunoensayo fluorescente, radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) e inmunoensayo magnético (MIA). La proteína de unión al antígeno descrito en la presente se puede marcar para facilitar la detección y/o cuantificación del compuesto. El experto en la técnica está familiarizado con el marcaje de proteínas de unión al antígeno que incluye el marcaje directo y el marcaje indirecto. En el marcaje directo, la propia

55

proteína de unión al antígeno se marca con un marcador detectable tal como, sin carácter limitante, un marcador con color, un marcador fluorescente, un marcador radiactivo o una partícula magnética. Los marcadores fluorescentes son especialmente útiles e incluyen, sin carácter limitante, el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y otros derivados de la fluoresceína, el isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y otros derivados de la rodamina, la proteína fluorescente R-picoeritrina (R-PE) y R-PE:cianina-5 y alofococianina. Como alternativa, el marcaje se puede llevar a cabo de una manera indirecta. En este caso la proteína de unión al antígeno descrita en la presente se puede unir a un compuesto secundario detectable o se fusiona o une a una etiqueta, que por sí misma no se puede detectar de manera directa pero que se puede detectar si se une a un compuesto secundario detectable. Resulta obvio para el experto en la técnica que la detección puede ser el resultado de una sucesión de acontecimientos tales como, sin carácter limitante, la unión en serie de los compuestos o la activación de la etiqueta tras la unión.

Una «muestra», tal como se utiliza en la presente, es una porción, trozo o segmento que es representativo del total que se quiere analizar en lo que se refiera a la presencia y/o concentración de uno o más polisacáridos quitinosos, preferentemente la quitina. Dicha muestra puede ser una parte que se ha extraído del total o puede ser el total medido en un punto representativo en el espacio y/o el tiempo, como es el caso en una muestra medida en línea por un biosensor durante la fermentación. A modo de ejemplo no limitante, dicha muestra puede ser una muestra de alimentos, donde es necesario determinar la presencia o concentración del polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, o modificarla en lo que se refiere a la capacidad alérgica de dicho polisacárido quitinoso, o en lo que se refiere a una característica física, química o microbiológica deseada o no deseada del polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, para modificar los parámetros de calidad de la materia alimentaria, tal como una vida útil modificada.

De manera similar, la quitina se utiliza a menudo como un aditivo alimentario, para mejorar la textura del material alimentario, como agente espesante y estabilizante y como potenciador natural del sabor. Se pudo utilizar la quitina para mejorar la calidad nutricional, tal como un aumento de la fibra alimentaria, para obtener un efecto reductor del colesterol, para reducir la adsorción de lípidos y como un agente antigastroitis (Shahidi *et al.*, 1999). La quitina y el quitosano se utilizan como antimicrobianos (Yalpani *et al.*, 1992). Sin embargo, la presencia de quitina en los alimentos también se puede deber a la contaminación fúngica o por levaduras y se ha utilizado la detección de la quitina como una medida de tal contaminación, tal como se divulga en los documentos WO9217786 y US5004699. Se necesita una proteína de unión al antígeno específica para distinguir entre las posibles fuentes y formas de quitina en los alimentos; las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente son especialmente adecuadas para este tipo de aplicaciones.

En la presente también se describe el uso de una proteína de unión al antígeno descrita en la presente para aislar o purificar un polisacárido quitinoso a partir de una muestra.

Se puede utilizar el aislamiento del polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, para purificar dicho polisacárido quitinoso a partir de una mezcla o puede que se utilice para eliminar de una muestra un polisacárido quitinoso contaminante o no deseado. El experto en la técnica está familiarizado con los métodos que utilizan las proteínas de unión al antígeno para aislar compuestos y estos incluyen, sin carácter limitante, la inmunoprecipitación y la cromatografía por afinidad. Como alternativa, la proteína de unión al antígeno descrita en la presente se puede unir a una membrana, con el fin de utilizarla en la filtración con membrana o técnicas similares. Los ejemplos no limitantes de dicho aislamiento y/o purificación aparecen en el tratamiento de aguas residuales.

Una realización preferida del uso de una proteína de unión al antígeno descrita en la presente en la purificación es la purificación de una proteína de fusión, que comprende una proteína de unión al antígeno descrita en la presente, de la manera más preferida un VHH que se une a la quitina. El experto en la técnica está familiarizado con las proteínas de fusión que consisten en dos o más proteínas, partes de proteínas o péptidos que están unidos entre sí, ya sea por medios químicos (tal como la reticulación o la unión covalente) o por métodos de ADN recombinante. El experto en la técnica está familiarizado con la inmovilización y purificación de proteínas de fusión recombinante, que comprenden un dominio de unión a la quitina, en una matriz de quitina y estas se han divulgado en los documentos US5258502 y WO03020745. El reemplazo o la combinación del dominio de unión a la quitina utilizando, respectivamente, una proteína de unión al antígeno de la quitina descrita en la presente presenta la ventaja de que la afinidad por la matriz será más elevada y/o el perfil de elución estará mejor definido y/o que el proceso de purificación será más eficaz.

En la presente también se describe un kit para detectar la presencia y/o determinar la concentración de un polisacárido quitinoso en una muestra, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno descrita en la presente.

Aparte de una proteína de unión al antígeno descrita en la presente, que se une a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, el kit puede comprender además los reactivos necesarios para marcar y/o detectar y/o cuantificar la proteína de unión al antígeno. En una realización preferida, el kit se utiliza para fines diagnósticos.

En la presente también se describe un biosensor para detectar la presencia y/o determinar la concentración de un polisacárido quitinoso en una muestra, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno descrita en la presente.

Preferentemente, la proteína de unión al antígeno se inmoviliza en la capa sensible del biosensor; la detección de la unión puede ser, a modo de ejemplo no limitante, óptica, electroquímica, mediante microequilibrio en cristal de cuarzo, mediante inmunosensores magnéticos o mediante inmunosensores basados en voladizos micromecánicos. El experto en la técnica está familiarizado con la tecnología de la inmovilización de la proteína de unión al antígeno y de la detección de la unión entre la molécula diana y la proteína de unión al antígeno y esta ha sido objeto de revisión, entre otros por Marquette y Blum (2006), Fritz (2008) y Skottrup *et al.*, (2008).

También se describe en la presente un agente de direccionamiento, capaz de unir un compuesto a un aminopolisacárido, donde dicho agente de direccionamiento comprende al menos una proteína de unión al antígeno descrita en la presente.

Un «agente de direccionamiento», tal como se utiliza en la presente, es una estructura molecular, preferentemente con un esqueleto peptídico, que comprende al menos una proteína de unión al antígeno descrita en la presente. Un agente de direccionamiento en su forma más sencilla está constituido tan solo por una única proteína de unión al antígeno; sin embargo, un agente puede comprender más de una proteína de unión al antígeno y puede ser monovalente o multivalente y monoespecífico o multiespecífico, tal como se define más adelante. Además de una única o de múltiples proteínas de unión al antígeno, un agente de direccionamiento puede comprender además otros restos, que se pueden acoplar o fusionar de manera química, ya sea una fusión N-terminal o C-terminal o incluso interna, con la proteína de unión al antígeno. Dicho otros restos incluyen, sin carácter limitante, uno o más aminoácidos, incluidos aminoácidos marcados (por ejemplo, marcados de manera fluorescente o de manera radioactiva) o aminoácidos detectables (por ejemplo, detectables con un anticuerpo), uno o más monosacáridos, uno o más oligosacáridos, uno o más polisacáridos, uno o más lípidos, uno o más ácidos grasos, una o más moléculas de bajo peso molecular o cualquier combinación de los anteriores. En una realización preferida, dichos otros restos actúan como espaciadores o conectores en dicho agente de direccionamiento.

Un «compuesto», tal como se utiliza en la presente, puede ser cualquier compuesto, preferentemente una sustancia activa, que incluye, sin carácter limitante, las proteínas y complejos proteicos tales como las enzimas o compuestos químicos, que incluyen, sin carácter limitante, las sustancias con actividad agroquímica, tal como se define más adelante. Preferentemente, un compuesto puede estar comprendido en un portador o sobre este, preferentemente un microportador, donde dicho portador se puede acoplar con uno o más agentes de direccionamiento que comprenden al menos una proteína de unión al antígeno descrita en la presente. La expresión «comprendido en un portador», tal como se utiliza en la presente, significa que está unido a este o contenido en este por medios tales como, sin carácter limitante, la inclusión, encapsulación y adsorción. Preferentemente, el portador es tal que se pueden incorporar, encapsular o incluir el compuesto o los compuestos en el portador, por ejemplo, en forma de una nanocápsula, microcápsula, nanoesfera, microsfera, liposoma o vesícula. Preferentemente, los portadores son tales que poseen unas características de liberación inmediata o gradual o lenta, por ejemplo, a lo largo de varios minutos, varias horas, varios días o varias semanas. Asimismo, los portadores pueden estar hechos de materiales (por ejemplo, polímeros) que se rompen o degradan lentamente (por ejemplo, debido a la exposición prolongada a una temperatura elevada o baja, luz solar, humedad elevada o baja u otras condiciones o factores medioambientales) con el tiempo (por ejemplo, a lo largo de minutos, horas, días o semanas) y de esta manera se libera el compuesto del portador.

El agente de direccionamiento descrito en la presente puede ser un agente de direccionamiento «monoespecífico» o un agente de direccionamiento «multiespecífico». Un agente de direccionamiento «monoespecífico» se refiere a un agente de direccionamiento que comprende una única proteína de unión al antígeno o que comprende dos o más proteínas de unión a antígeno diferentes que están dirigidas cada una de ellas al mismo sitio de unión. Por lo tanto, un agente de direccionamiento monoespecífico es capaz de unirse a un único sitio de unión, ya sea mediante una única proteína de unión al antígeno o mediante múltiples proteínas de unión al antígeno. Un agente de direccionamiento «multiespecífico» se refiere a un agente de direccionamiento que comprende dos o más proteínas de unión a antígeno que están dirigidas cada una de ellas a diferentes sitios de unión. Así pues, un agente de direccionamiento «bienespecífico» es capaz de unirse a dos sitios de unión diferentes; un agente de direccionamiento «triespecífico» es capaz de unirse a tres sitios de unión diferentes; y así sucesivamente para los agentes de direccionamiento «multiespecíficos». Asimismo, en lo que se refiere a los agentes de direccionamiento descritos en la presente, se utiliza el término «monovalente» para indicar que el agente de direccionamiento comprende una única proteína de unión al antígeno; el término «bivalente» se utiliza para indicar que el agente de direccionamiento comprende en total dos proteínas únicas de unión al antígeno; el término «trivalente» se utiliza para indicar que el agente de direccionamiento comprende en total tres proteínas únicas de unión al antígeno; y así sucesivamente para los agentes de direccionamiento «multivalentes».

La expresión «capaz de unir un compuesto a un polisacárido quitinoso», tal como se utiliza en la presente, significa que la unión de la proteína de unión al antígeno, comprendida en el agente de direccionamiento, al polisacárido quitinoso es lo suficientemente fuerte para unir dicho compuesto a un polisacárido quitinoso. Preferentemente, el compuesto está comprendido en un portador o sobre este, más preferentemente un microportador. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento se acopla mediante unión por afinidad o mediante unión covalente a dichos compuestos, aún más preferentemente a dicho portador que contiene dichos compuestos. Preferentemente, dicho polisacárido quitinoso es la quitina. Preferentemente, dicho polisacárido quitinoso está comprendido en una superficie sólida o inmovilizado sobre una superficie sólida.

El experto en la técnica está familiarizado con los métodos para acoplar el compuesto, preferentemente dicho agente potenciador vegetal, y/o portador al agente de direccionamiento y estos incluyen, sin carácter limitante, la unión covalente y la unión por afinidad. Un ejemplo de la unión covalente es una proteína de fusión, donde se producen el agente de direccionamiento y un compuesto de naturaleza proteínica, preferentemente, mediante la expresión de proteína recombinante, como una unidad. Una estrategia alternativa a la utilización de las proteínas de fusión consiste en utilizar la reticulación química de residuos en el agente de direccionamiento para la unión covalente con el compuesto, el cual puede ser una segunda proteína u otro compuesto químico, utilizando la química de acoplamiento tradicional, por ejemplo, tal como la describe Fipula (2007) y Bioconjugate Techniques, Hermanson, ed. Academic Press Inc., San Diego, CA, EE. UU., (2008). Los residuos aminoacídicos que incorporan grupos de sulfidrido, tales como la cisteína, se pueden unir de manera covalente utilizando un reactivo biespecífico tal como, por ejemplo, el maleimidofenilbutirato de succinimidilo (SMPB, por sus siglas en inglés). Como alternativa, los grupos de lisina ubicados en la superficie proteica se pueden acoplar a los grupos carboxilo activados en la segunda proteína mediante el acoplamiento tradicional con carbodiimida utilizando 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS). El acoplamiento entre el agente de direccionamiento y el compuesto o portador que comprende el compuesto, puede ser directo o se puede utilizar una molécula espaciadora o de bisagra. Se pueden consultar ejemplos de tales espaciadores en los documentos WO0024884 y WO0140310.

En una realización preferida, dicha proteína de unión al antígeno comprendida en el agente de direccionamiento descrito en la presente se une a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, que está comprendido o se deriva de un artrópodo, preferentemente un insecto, y/o el agente de direccionamiento resultante es capaz de unir un compuesto a un artrópodo, preferentemente un insecto.

En otra realización preferida, dicha proteína de unión al antígeno comprendida en el agente de direccionamiento descrito en la presente se une a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, que está comprendido o se deriva de un hongo o levadura, y/o el agente de direccionamiento resultante es capaz de unir un compuesto a un hongo o una levadura.

En otra realización preferida diferente adicional, dicho compuesto es una sustancia con actividad agroquímica, tal como se define más adelante, con actividad insecticida o antifúngica, tal como se ha definido anteriormente.

También se describe en la presente el uso de un agente de direccionamiento descrito en la presente, para dirigir un compuesto a un polisacárido quitinoso.

El término «dirigir», tal como se utiliza en la presente, significa que el compuesto se suministra en su sitio de acción o cerca de este, donde se puede unir posteriormente a un polisacárido quitinoso mediante una proteína de unión al antígeno descrita en la presente que está comprendida en el agente de direccionamiento. Con el fin de ser capaz de unir, preferentemente retener, un compuesto, preferentemente una sustancia con actividad agroquímica, a un polisacárido quitinoso, un único o múltiples agentes de direccionamiento se fusionan o se unen al compuesto, preferentemente la sustancia con actividad agroquímica, mediante un enlace covalente, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas débiles de Van der Waals o mediante cualquier combinación de los anteriores. El término «mezclado», tal como se utiliza en la presente, significa acoplado con, conectado con, anclado con, mezclado con o que cubre. Preferentemente, el compuesto, más preferentemente la sustancia con actividad agroquímica, está comprendido en un portador o sobre este, preferentemente un microportador. Preferentemente, el polisacárido quitinoso, más preferentemente la quitina, está comprendido en una superficie sólida o inmovilizado sobre una superficie sólida.

El direccionamiento de un compuesto o una combinación de compuestos con el agente de direccionamiento descrito en la presente se puede referir a cualquier direccionamiento que conozca el experto en la técnica e incluye, sin carácter limitante, dirigir una enzima a su sustrato o dirigir una fragancia o color a matrices que contienen polisacáridos quitinosos. Ciertamente, se sabe que los dominios de unión a la quitina desempeñan una función esencial en la especificidad de las quitinasas; Neeraja *et al.* (2010a) han demostrado que la actividad y la estabilidad conformacional de la quitinasa se puede mejorar con la fusión a un dominio de unión a la celulosa. Se puede obtener un efecto similar fusionando un dominio catalítico que digiere polisacáridos quitinosos (tal como un dominio catalítico de tipo quitinasa) a una proteína de unión al antígeno descrita en la presente. Otras aplicaciones, tales como el uso de agentes de ablandamiento, lubricantes poliméricos, agentes fotoprotectores, látex, resinas, agentes que fijan tintes, materiales encapsulados antioxidantes, insecticidas, agentes antimicrobianos, agentes que repelen la tierra o agentes que liberan la tierra, así como también otros agentes de elección, y los modos y tiempos de adición de los agentes a una matriz que contienen polisacáridos están totalmente comprendidos en las competencias del experto en la técnica.

En una realización preferida, dicho compuesto, preferentemente dicha sustancia con actividad agroquímica, se dirige a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, que está comprendida o se deriva de un artrópodo, tal como se ha definido anteriormente.

En otra realización preferida, dicho compuesto, preferentemente dicha sustancia con actividad agroquímica, se dirige a un polisacárido quitinoso, preferentemente la quitina, que está comprendida o se deriva de un hongo o levadura. Ciertamente, se sabe que la quitina es parte de la pared celular fúngica y se puede utilizar para dirigir un compuesto

o una combinación de compuestos al organismo fúngico. A modo de ejemplo no limitante, se puede acoplar una proteína de unión al antígeno de la quitina descrita en la presente a una sustancia con actividad agroquímica, tal como se define más adelante, preferentemente con actividad antifúngica, como se ha definido previamente, para suministrar de esta manera la sustancia con actividad agroquímica al hongo sin contaminar, o contaminando mínimamente, el entorno, lo que conlleva en última instancia un nivel más bajo de dicha sustancia con actividad agroquímica en el cultivo que se está tratando con la sustancia con actividad agroquímica dirigida de esta manera.

En otra realización preferida diferente adicional, dicho compuesto es una sustancia con actividad agroquímica, tal como se define más adelante, con actividad insecticida o antifúngica, tal como se ha definido anteriormente.

También se describe en la presente una composición que comprende (i) al menos un agente de direccionamiento descrito en la presente y (ii) uno o más compuestos.

Preferentemente, dichos compuestos están comprendidos o están sobre un portador adecuado, preferentemente un microportador. Preferentemente, dicho agente de direccionamiento se acopla mediante unión por afinidad o mediante unión covalente a dichos compuestos, aún más preferentemente a dicho portador que contiene dichos compuestos. Preferentemente, dicho compuesto o combinación de compuestos son sustancias con actividad agroquímica, tal como se define a continuación.

En una realización preferida, dicha composición es una composición agroquímica. Una «composición agroquímica», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una composición para un uso agroquímico, tal como se define más adelante, que comprende al menos una sustancia con actividad agroquímica, tal como se define más adelante, de manera opcional con uno o más aditivos que favorecen una dispersión, atomización, depósito, humectación foliar, distribución, retención y/o captación de los agentes agroquímicos óptimos. A modo de ejemplo no limitante, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, surfactantes, agentes humectantes, agentes dispersantes, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes tamponantes, acidificantes, agentes contra la sedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas y/o agentes de control del arrastre.

La expresión «uso agroquímico», tal como se utiliza en la presente, no solamente incluye el uso de composiciones agroquímicas tal como se han definido anteriormente que son adecuadas y/o que están destinadas para su uso en los campos de cultivo (por ejemplo, agricultura) sino que también incluye el uso de composiciones agroquímicas destinadas a su uso en los cultivos de invernadero (por ejemplo, horticultura/floricultura) o sistemas de cultivo hidropónico o usos en espacios verdes públicos o privados (por ejemplo jardines privados, parques o campos de deporte), para proteger plantas o partes de la planta incluidos, sin carácter limitante, los bulbos, tubérculos, frutos y semillas (por ejemplo, de organismos dañinos, enfermedades o plagas), para controlar, preferentemente promover o aumentar, el crecimiento de las plantas; y/o para estimular el rendimiento de las plantas o las partes de la planta que se recolectan (por ejemplo, sus frutos, flores, semillas, etc.) e incluso el uso de composiciones agroquímicas que son adecuadas y/o que se destinan para usos no relacionados con las plantas tales como usos domésticos (por ejemplo, herbicidas o insecticidas para uso doméstico o agentes para proteger las telas o la madera del daño provocado por organismos dañinos), o usos industriales (por ejemplo, agentes para prevenir el ensuciado o para proteger los bienes almacenados del daño de los organismos dañinos) o usos por parte de operadores del control de las plagas (por ejemplo, para controlar insectos y roedores no deseados, etc.).

La expresión «sustancia con actividad agroquímica», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier sustancia o principio activo que se puede utilizar para un uso agroquímico, tal como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de tales sustancias con actividad agroquímica serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, compuestos que son activos como insecticidas (por ejemplo, insecticidas de contacto o insecticidas sistémicos, incluidos los insecticidas para uso doméstico), acaricidas, miticidas, herbicidas (por ejemplo, herbicidas de contacto o herbicidas sistémicos, incluidos los herbicidas para uso doméstico), fungicidas (por ejemplo, fungicidas de contacto o fungicidas sistémicos, incluidos los fungicidas para uso doméstico), nematocidas (por ejemplo, nematocidas de contacto o nematocidas sistémicos, incluidos nematocidas para uso doméstico) y otros pesticidas (por ejemplo, avicidas, molusquicidas, piscicidas) o biocidas (por ejemplo, agentes para destruir bacterias, algas o caracoles); así como también fertilizantes; reguladores del crecimiento tales como hormonas vegetales; micronutrientes, protectores; feromonas; repelentes; cebos (por ejemplo, cebos para insectos o cebos para caracoles); y/o principios activos que se utilizan para modular (es decir, incrementar, disminuir, inhibir, potenciar y/o desencadenar) la expresión génica (y/u otros procesos biológicos o bioquímicos) en la planta diana o por parte de esta (por ejemplo, la planta que se va a proteger o la planta que se está controlando). Las sustancias con actividad agroquímica incluyen los agentes químicos pero también los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN monocatenario o bicatenario, por ejemplo, tal como el utilizado en el contexto de la tecnología de iARN), péptidos, polipéptidos, proteínas (incluidas las proteínas de unión al antígeno) y microorganismos. El término «microorganismos», tal como se utiliza en la presente, se refiere a bacterias, hongos, levaduras, virus y similares. Los ejemplos de tales sustancias con actividad agroquímica serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen, sin carácter limitante: glifosato, paraquat, metolaclor, acetoclor, mesotriona, 2,4-D, atrazina, glufosinato, sulfosato, fenoxaprop, pendimetalina, picloram, trifluralina, bromoxinilo, clodinafop, fluroxipir, nicosulfurón, bensulfurón, imazetapir, dicamba, imidacloprid, thiametoxam, fipronilo, clorpirifos, deltametrina, lambda-cihalotrina, endosulfano, metamidofos, carbofurano, clotianidina, cipermetrina, abamectina, diflufenicano, espinosad, indoxacarb, bifentrina, teflutrina, azoxistrobina, tiametoxam, tebuconazol, mancozeb, ciazofamid, fluazinam, piraclostrobina, epoxiconazol,

clorotalonilo, fungicidas de cobre, trifloxistrobina, protriocanazol, difenoconazol, carbendazim, propiconazol, tiofanato, azufre, boscalid y otros agroquímicos conocidos o cualquier combinación o combinaciones adecuadas de estos. Otros agentes agroquímicos adecuados serán evidentes para el experto a partir de la divulgación de la presente y, por ejemplo, pueden ser cualquier agente agroquímico comercializado y, por ejemplo, incluir cada uno de los compuestos enumerados en Phillips McDougall, AgriService noviembre 2007 V4.0, Sección de Productos – 2006 Mercado, Índice de Productos págs. 10-20. Dichas sustancias con actividad agroquímica se pueden presentar en diferentes formas que incluyen, sin carácter limitante, como cristales, como microcristales, como nanocristales, como cocristales, como un polvo, como gránulos, como un polvillo, como comprimidos, como gel, como un concentrado soluble, como una emulsión, como un concentrado emulsionable, como una suspensión, como un concentrado en suspensión, como una suspoemulsión, como una dispersión, como un concentrado en dispersión, como una suspensión de microcápsulas o como cualquier otra forma o tipo de formulación agroquímica evidente para los expertos en la técnica. Las sustancias con actividad agroquímica puede que no sólo incluyan sustancias o principios activos listos para usar sino también precursores en una forma inactiva que los factores externos puedan activar. A modo de ejemplo no limitante, el precursor se puede activar por medio de cambios en el pH, provocados por las heridas de las plantas tras el daño debido a los insectos, mediante la acción enzimática provocada por el ataque fúngico o mediante los cambios de temperatura o cambios en la humedad.

La composición agroquímica descrita en la presente puede estar en una forma líquida, semisólida o sólida y, por ejemplo, se puede mantener como un aerosol, polvo fluido, polvo humectable, gránulo humectable, concentrado emulsionable, concentrado en suspensión, microemulsión, suspensión de cápsulas, microcápsula seca, comprimido o gel que se va a suspender, dispersar, emulsionar o colocar en un entorno líquido adecuado de otra manera (tal como el agua u otro medio acuoso, orgánico u oleoso adecuado) para el almacenamiento o la aplicación. La composición agroquímica descrita en la presente comprende al menos una, preferentemente más proteínas de unión al antígeno descritas en la presente. La presencia de una o más proteínas de unión al antígeno descritas en la presente en la composición agroquímica descrita en la presente, garantiza la unión de la sustancia con actividad agroquímica a su sitio de acción, tal como la planta con la parte de la planta (por ejemplo, el fruto, tubérculo o bulbo), la semilla de la planta u otro material orgánico derivado de la planta, a la vez que se evita que la sustancia con actividad agroquímica se adhiera a los envases de almacenamiento y/o al equipo del operador. Opcionalmente, la composición puede comprender además uno o más componentes adicionales tales como, sin carácter limitante, diluyentes, disolventes, adyuvantes, surfactantes, agentes humectantes, agentes dispersantes, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes tamponantes, acidificantes, agentes contra la sedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas y/o agentes de control del arrastre, adecuados para su uso en la composición descrita en la presente.

En una realización preferida, dicha composición agroquímica comprende ejercer una actividad antifúngica, tal como se ha definido anteriormente.

En otra realización preferida, dicha composición agroquímica comprende ejercer una actividad insecticida, tal como se ha definido anteriormente.

La presente divulgación también engloba un método para producir una composición, preferentemente una composición agroquímica, descrita en la presente, comprendiendo dicho método (i) seleccionar al menos uno, preferentemente más agentes de direccionamiento descritos en la presente y (ii) acoplar dicho agente o agentes de direccionamiento a las semillas a un compuesto, preferentemente una sustancia con actividad agroquímica, o una combinación de compuestos y, opcionalmente, (iii) añadir además componentes que pueden ser adecuados para tales composiciones, preferentemente para las composiciones agroquímicas. Preferentemente, dicho compuesto está comprendido en un portador, más preferentemente, dicho agente o agentes de direccionamiento están acoplados al portador, comprenden el compuesto, preferentemente la sustancia con actividad agroquímica.

En la presente también se describe un método para mejorar la resistencia de una planta contra plagas de insectos y/o enfermedades fúngicas, comprendiendo dicho método al menos una aplicación de una composición descrita en la presente a la planta o a partes de la planta.

Si es necesario, dicha composición se disuelve, suspende y/o diluye en una solución adecuada antes de su uso. La aplicación a la planta o partes de la planta se lleva a cabo utilizando cualquier técnica manual o mecánica adecuada o deseada para aplicar una composición agroquímica incluida, sin carácter limitante, la pulverización, aplicación con cepillo, revestimiento, goteo, inmersión, recubrimiento, dispersión, aplicación en forma de microgotas pequeñas, como una niebla o un aerosol. La expresión «mejorar la resistencia de una planta», tal como se utiliza en la presente, se refiere a proteger la planta contra el daño o la reducción de rendimiento provocado por las plagas de insectos (tal como se ha definido anteriormente) o mediante organismos que provocan enfermedades fúngicas (tal como se ha definido anteriormente). Ciertamente, ya que la composición descrita en la presente tiene una actividad insecticida o antifúngica, la aplicación de dicha composición a la planta puede ayudar a la planta a combatir el daño y, por lo tanto, a prevenir las pérdidas de rendimiento, provocadas por las plagas de insectos u organismos que provocan enfermedades fúngicas. La expresión «parte de la planta», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier parte de la planta ya sea la parte de una planta viva o en crecimiento intacta, o aislada o separada de una planta e incluso se puede contemplar el material de una planta muerta. Preferentemente dichas partes de la planta se seleccionan a partir del grupo constituido por hojas, raíces, frutos, conos, flores, semillas, bulbos y tubérculos.

En una realización preferida, dicha planta es un cultivo. El término «cultivo», tal como se utiliza la presente, se refiere a una especie o variedad de plantas que se cultiva para ser recolectada como alimento, forraje para el ganado, materia prima para combustibles o para cualquier otro objetivo económico. A modo de un ejemplo no limitante, dichos cultivos pueden ser el maíz, cereales tales como el trigo, centeno, cebada y avena, sorgo, arroz, remolacha azucarera y remolacha forrajera, fruta tal como fruta de tipo pomo (por ejemplo, manzanas y peras), fruta cítrica (por ejemplo, naranjas, limones, limas, pomelos o mandarinas), fruta de tipo drupa (por ejemplo, melocotones, nectarinas o ciruelas), frutos secos (por ejemplo, almendras o nueces), frutas del bosque (por ejemplo, cerezas, fresas, moras o frambuesas), la familia *Plantaginaceae* o las vides, cultivos leguminosos tales como las habas, lentejas, guisantes y soja, cultivos oleaginosos tales como el girasol, cártamo, colza, canola, ricino u olivos, curcubitáceas tales como los pepinos, melones o calabazas, las plantas con fibra tales como el algodón, lino o cáñamo, cultivos para combustible tales como la caña de azúcar, *Miscanthus* o pasto varilla, hortalizas tales como las patatas, tomates, pepinos, lechuga, espinacas, cebollas, zanahorias, berenjenas, espárragos o repollo, ornamentales tales como las flores (por ejemplo, petunias, *Pelargonium*, rosas, tulipanes, azucenas o crisantemos), arbustos, árboles latifolios (por ejemplo, álamos o sauces) y de hoja perenne (por ejemplo las coníferas), pastos tales como el césped, hierba o pasto forraje u otras plantas útiles tales como las plantas del café, té, tabaco, lúpulo, pimienta, caucho y látex.

En la presente también se describe una planta, transformada con un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al antígeno descrito en la presente o cualquier fragmento adecuado de esta.

Con el fin de transformar una planta con un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de una proteína de unión al antígeno descrita en la presente o cualquier fragmento adecuado de esta, el ácido nucleico de la proteína de unión al antígeno descrita en la presente se clona en primer lugar en un vector de expresión adecuado, que el experto en la técnica conoce. Posteriormente, el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión al antígeno descrita en la presente, o cualquier fragmento adecuado de esta, se utiliza para transformar, mediante métodos conocidos por el experto en la técnica que incluyen, sin carácter limitante, la transformación mediada por *Agrobacterium*, electroporación, microinyección o bombardeo con partículas recubiertas con ADN o ARN u otros métodos de este tipo conocidos por el experto en la técnica, células vegetales o tejido vegetal adecuados y, en última instancia, se regenera a partir de dichas células vegetales o tejido vegetal transformados una planta que incorpora en su genoma la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión al antígeno descrita en la presente.

En una realización preferida, dicha planta es un cultivo, tal como se ha definido anteriormente.

En otra realización preferida, dicha planta, preferentemente dicho cultivo, es más resistente al daño por parte de plagas de insectos o una enfermedad fúngica, tal como se ha definido anteriormente. Ciertamente, ya que la planta expresa una proteína de unión al antígeno descrita en la presente, que puede tener actividad insecticida o fungicida tal como se ha descrito previamente, la planta puede ser más capaz de combatir el daño, y por lo tanto prevenir las pérdidas de rendimiento, provocado por las plagas de insectos o los organismos que provocan enfermedades fúngicas en comparación con una planta no transformada con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al antígeno descrita en la presente o cualquier fragmento adecuado de esta.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación y selección de VHH

Inmunización de llamas con homogeneizados de insectos - Se diseccionaron escarabajos de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*; CPB), se recogieron los exoesqueletos y las alas y se desechó el resto. Los exoesqueletos y las alas se congelaron por separado en nitrógeno líquido, se molieron en un mortero y se recogieron los polvos finos. Se congelaron las larvas de CPB, áfidos del guisante (*Acyrtosiphon pisum*) y larvas del gusano del capullo del tabaco (*Heliothis virescens*) en nitrógeno líquido, se molieron en un mortero y se recogieron los polvos finos. Los materiales recogidos de los insectos se resuspendieron en PBS y se determinó la concentración de proteínas total de las suspensiones con el ensayo de proteínas de Bradford. La concentración de proteínas total aproximada fue de 4.2, 0.3, 4.2, 2.7 y 2.3 mg/mL para las suspensiones exoesqueletos de CPB, alas de CPB, áfidos del guisante, larvas de CPB y larvas del gusano del capullo del tabaco, respectivamente. Se mezclaron las suspensiones de manera que la concentración de proteínas totales fuera igual y se prepararon alícuotas, se almacenaron a -80 °C y se utilizaron las suspensiones para la inmunización.

Se inmunizaron dos llamas, concretamente Curley Sue y Jean Harlow, a intervalos semanales con 6 inyecciones intramusculares de suspensiones de insectos mixtas utilizando el Adyuvante Incompleto de Freund (FIA, por sus siglas en inglés). Las dosis de las inmunizaciones fueron de 125 µg de proteínas total en los días 0 y 6, y 62.5 µg de proteínas total en los días 13, 20, 27 y 34. Se recogió el suero de las llamas en el día 0 y en el momento de la recogida de los linfocitos de la sangre periférica en el día 38.

Construcción de la colección - Se generó una colección de VHH independiente para cada llama inmunizada. Se aisló el ARN de los linfocitos de la sangre periférica, después se sintetizó el ADNc utilizando cebadores de

hexámeros aleatorios y Superscript III de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Se realizó una primera PCR para amplificar los fragmentos de ADN de VHH y VH utilizando una mezcla de cebadores directos [relación 1:1 de call001 (5'-gtcctggctgctcttctacaagg-3') y call001b (5'-cctggctgctcttctacaaggtg-3')] y cebador inverso call002 (5'-ggtagctgctgttgaactgtcc-3'). Después de la separación de los fragmentos de ADN de VH y VHH mediante electroforesis en gel de agarosa y la purificación de los fragmentos de ADN de VHH a partir del gel, se llevó a cabo una segunda PCR con ADN de VHH para introducir sitios de restricción apropiados para la clonación utilizando el cebador directo A6E (5'-gatgtgcagctgcaggagtctggrgagg-3') y el cebador inverso 38 (5'-ggactagtgcggccgctggagacgggtgacctgggt-3'). Se digirieron los fragmentos de la PCR utilizando las enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*91I (Fermentas) y se ligaron en dirección 5' respecto al gen pIII en el vector pMES3. Los productos de la ligación se precipitaron con etanol y se hicieron precipitar de acuerdo con los protocolos estándar, se resuspendieron en agua y se utilizaron para electroporar células TG1. Los tamaños de las colecciones fueron de al menos 1E+08 clones independientes para cada colección. Se realizó una PCR de colonia única en clones elegidos al azar a partir de las colecciones para evaluar los porcentajes de inserción de las colecciones. Las colecciones «Curley Sue» y «Jean Harlow» tuvieron unos porcentajes de inserción de clones completos $\geq 80\%$. Las colecciones se numeraron 44 y 35 para las llamas «Curley Sue» y «Jean Harlow», respectivamente. Se generaron fagos a partir de cada una de las colecciones utilizando el fago auxiliar VCSM13 de acuerdo con los procedimientos habituales.

Selección de fagos contra la quitina - Para las selecciones contra la quitina, se recubrieron placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) con quitina de calidad práctica (Sigma). Se disolvió la quitina con una concentración de 10 mg/mL en ácido fosfórico al 85% agitando en un agitador vorticial durante aproximadamente 3 horas hasta que se disolvieron todas las partículas. Se prepararon diluciones en serie con un factor de 5 en PBS, la quitina precipitada se eliminó centrifugando a 20 000 g durante 5 minutos y se utilizaron los sobrenadantes para recubrir las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc). Se recubrieron los pocillos con 100 μ L por pocillo de las soluciones de quitina a 4 °C durante toda la noche o durante todo el fin de semana. Se utilizó el suero de las llamas Curley Sue y Jean Harlow para determinar la concentración óptima de quitina para recubrir en un ELISA de título del suero realizado de acuerdo con procedimientos habituales. Se utilizaron soluciones de quitina diluidas 25 veces y 3125 veces para las selecciones. Se lavaron los pocillos 3 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloquearon con un 5% de leche desnatada en PBS (MPBS al 5%). Se suspendieron los fagos en MPBS al 2.5% y se utilizaron aproximadamente 1E+12 cfu para cada pocillo. Después de la unión a los pocillos a la temperatura ambiente durante 2 horas, se eliminaron los fagos que no se habían unido lavando exhaustivamente con PBS/0.05% de Tween-20 y PBS. Se eluyeron los fagos unidos a la temperatura ambiente con 0.1 mg/mL de tripsina (Sigma) en PBS durante 30 minutos. Se transfirieron los fagos eluidos a una placa de 96 pocillos de polipropileno (Nunc) que contenía un exceso del inhibidor de la tripsina AEBSF (Sigma). Se compararon los títulos de los fagos recubiertos con la diana con los títulos de los fagos de los pocillos blanco para evaluar el enriquecimiento. Se amplificaron los fagos utilizando células TG1 frescas de acuerdo con los procedimientos habituales. El enriquecimiento en la ronda de selección 1 fue de aproximadamente 10 veces para las dos librerías, 44 y 45. El enriquecimiento en la ronda de selección 2 fue de 5 y $\geq 3E+03$ veces para las librerías 44 y 45, respectivamente.

Recogidas de colonias únicas a partir de las lecturas de la selección - Se infectaron células TG1 frescas con fagos eluidos diluidos en serie y se colocaron en placas con agar LB; 2% de glucosa; 100 μ g/mL de ampicilina. Se recogieron colonias únicas en placas de 96 pocillos que contenían 100 μ L por pocillo de 2xTY; 10% de glicerol; 2% de glucosa; 100 μ g/mL de ampicilina. Se incubaron las placas a 37 °C y se almacenaron a -80 °C como placas maestras. Para las selecciones contra la quitina se recogieron 16 clones de las selecciones de la 1.^a ronda y se recogieron 30 clones de las selecciones de la 2.^a ronda para cada colección 44 y 45, en total 92 clones.

Ejemplo 2: caracterización de VHH

ELISA de unión de punto único - Se utilizó un ELISA de unión de punto único para identificar los clones que se unen a los extractos vegetales. Se prepararon los extractos que contenían VHH para el ELISA de la siguiente manera. Se inocularon las placas de 96 pocillos que tenían 100 μ L por pocillo de 2xTY, 2% de glucosa, 100 μ g/mL de ampicilina con las placas maestras y se cultivaron a 37 °C durante toda la noche. Se utilizaron 25 μ L por pocillo del cultivo de toda la noche para inocular placas nuevas de 96 pocillos con pocillos profundos que contenían 1 mL por pocillo de 2xTY; 0.1% de glucosa; 100 μ g/mL de ampicilina. Después de cultivar a 37 °C en un incubador en agitación durante 3 horas, se añadió IPTG con una concentración final de 1 mM y se produjeron VHH recombinantes durante una incubación adicional de 4 horas. Se sedimentaron las células centrifugando a 3000 g durante 20 minutos, se desecharon los sobrenadantes y se almacenaron los sedimentos a -20 °C durante toda la noche. Se descongelaron los sedimentos celulares, se agitaron brevemente en un vórtex y se añadieron 125 μ L por pocillo de PBS a la temperatura ambiente. Se resuspendieron las células en una plataforma agitadora para ELISA a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugaron las placas a 3000 g durante 20 minutos y se transfirieron 100 μ L por pocillo de extracto que contenía VHH a una placa de 96 pocillos de polipropileno (Nunc) y se almacenaron a -20 °C hasta un uso posterior. Se analizó la unión de los clones de las selecciones con quitina utilizando placas de ELISA recubiertas con 100 μ L por pocillo de quitina diluida 25 veces, preparada de manera similar para todas las selecciones. Después del recubrimiento a 4 °C durante toda la noche y una prolongación de recubrimiento a la temperatura ambiente durante 1 hora el día siguiente, se lavaron las placas 3 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloquearon con un 5% de leche desnatada en PBS durante 1.5 horas. Se vaciaron las placas y se rellenaron con 90 μ L por pocillo de MPBS al 1%. Se añadieron 10 μ L de extracto que contenía VHH de cada clon a uno o más pocillos recubiertos con el antígeno y un pocillo blanco. Se permitió la adhesión de VHH a

la temperatura ambiente durante 1 hora y se eliminaron los VHH que no se habían unido lavando tres veces con PBS/0.05% de Tween-20. Se detectaron los VHH unidos con incubaciones en serie con anticuerpos monoclonales de ratón contra la histidina (Abd Serotec) en MPBS al 1%/0.05% de Tween-20 y anticuerpos de conejo de molécula completa contra IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalilina (RaM/AP) (Sigma) en MPBS al 1%/0.05% de Tween-20. Se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido lavando tres veces con PBS/0.05% de Tween-20. Se lavaron las placas dos veces más con PBS y se añadieron 100 µL del sustrato pNPP-disodio hexahidratado (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm y se calculó para cada clon la relación de VHH unido al pocillo o los pocillos recubiertos con la diana y un pocillo recubierto con un compuesto que no era la diana. De las selecciones contra la quitina 28 de los 92 (30%) clones tuvieron una relación superior a 2 y se analizaron estos clones adicionalmente por secuenciación.

PCR de colonia única y secuenciación - Se llevó a cabo una PCR de colonia única y secuenciación en los clones positivos en el ELISA de la siguiente manera. Se diluyeron 10 veces en agua estéril los cultivos de los pocillos de la placa maestra con clones positivos en el ELISA. Se utilizaron 5 µL de estos clones diluidos como molde para la PCR utilizando el cebador directo MP57 (5'-ttatgcttccggctcgtatg-3') y el cebador inverso GIII (5'-ccacagacagcctcatag-3'). Se secuenciaron los productos de la PCR mediante la secuenciación de Sanger utilizando el cebador MP57 (VIB Genetic Service Facility, Universidad de Antwerp, Bélgica). Se detectaron los clones VHH 15A9, VHH 15D1, VHH 15E4 y VHH 15G2 a partir de las selecciones contra la quitina. Los clones VHH 15E4 y VHH 15G2 son variantes del clon 15D1 con una y dos sustituciones de aminoácidos, respectivamente.

Producción y purificación de anticuerpos - Se produjeron VHH en la cepa supresora TG1 o no supresora WK6 de *E. coli* (Fritz *et al.*, 1988) de acuerdo con los procedimientos habituales. Resumiendo, se generaron colonias aisladas sembrando en estrías y se inocularon cultivos de toda la noche a partir de colonias únicas en 2xTY; 2% de glucosa; 100 µg/mL de ampicilina. Se utilizaron los cultivos de toda la noche para inocular cultivos frescos 1:100 en 2xTY; 0.1% de glucosa; 100 µg/mL de ampicilina. Después de cultivar a 37 °C en un incubador en agitación durante 3 horas, se añadió IPTG con una concentración final de 1 mM y se produjeron VHH recombinantes durante una incubación adicional de 4 horas. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en 1/50 del volumen del cultivo original de tampón de extracción periplasmático (fosfato 50 mM pH 7; NaCl 1 M; EDTA 1 mM) y se incubaron con una rotación cabeza sobre cabeza a 4 °C durante toda la noche. Se sedimentaron los esferoplastos centrifugando a 3000 g y 4 °C durante 20 minutos. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se centrifugaron de nuevo a 3000 g y 4 °C durante 20 minutos. Se purificaron los VHH etiquetados con hexahistidina del extracto periplasmático utilizando 1/15 del volumen del extracto de la resina de afinidad con metales TALON (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se concentraron los VHH purificados y se sometieron a diálisis con PBS utilizando dispositivos con un valor de corte del peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 5 kDa (Sartorius Stedim), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 3: VHH que se unen a polisacáridos quitinosos en el ELISA

VHH que se unen a la quitina en el ELISA - Se realizó la titulación de VHH en placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) recubiertas con quitina. Se disolvió la quitina con una concentración de 10 mg/mL en ácido fosfórico al 85% agitando en un agitador vorticial durante aproximadamente 3 horas hasta que se disolvieron todas las partículas. Se diluyó la quitina disuelta 25 veces en PBS y se eliminó la quitina precipitada centrifugando a 20 000 g durante 5 minutos. Se utilizaron 100 µL por pocillo de sobrenadante para recubrir las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc). Se recubrieron las placas a 4 °C durante toda la noche y se prolongó el recubrimiento a la temperatura ambiente durante 1 hora el día siguiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloquearon con un 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Se preparó una disolución en serie con un factor de 4 de los VHH purificados en MPBS al 1%/0.05% de Tween-20 en placas de 96 pocillos de polipropileno. Las concentraciones de anticuerpos estuvieron comprendidas entre 3 µg/mL y 12 ng/mL. Se transfirieron las diluciones de los anticuerpos a las placas recubiertas con quitina y se permitió la adhesión de VHH durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se detectaron los VHH unidos con incubaciones en serie con anticuerpos monoclonales de ratón contra la histidina (Abd Serotec) y anticuerpos de conejo de molécula completa contra IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalilina (RaM/AP) (Sigma) en MPBS al 1%/0.05% de Tween-20. Se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido lavando tres veces con PBS/0.05% de Tween-20 después de cada incubación con el anticuerpo. Se lavaron las placas dos veces más con PBS y se añadieron 100 µL del sustrato pNPP-disodio hexahidratado (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm y se representó gráficamente en función de la concentración de anticuerpos (remítase a la Tabla 1).

Tabla 1: VHH que se unen a la quitina en el ELISA:

[VHH] (µg/mL)	3.0	0.75	0.19	0.047	0.012	0
[VHH] (nM)	200	50	13	3.1	0.78	0
Quitina	+	+	+	+	+	+
	1	2	3	4	5	6

VHH15A9	A	≥4.000	2.059	0.640	0.225	0.112	0.090
VHH15D1	B	2.669	1.459	0.392	0.121	0.089	0.088
VHH no relacionado	C	0.089	0.086	0.089	0.089	0.085	0.088

Especificidad de VHH que se une a la quitina en el ELISA

Con el fin de investigar la especificidad de los VHH que se unen a la quitina, se utilizó un ELISA con diferentes recubrimientos. Se estudió la unión de VHH 15A9, así como también condiciones de control con otros anticuerpos, a la quitina, pectina y lectina de patata. Se recubrieron las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) con 100 µL por pocillo de quitina, de manera similar a en el ELISA de titulación, 100 µg/mL de pectina esterificada de frutas cítricas al 20-34% (Sigma) o lectina de patata (Sigma) en PBS. Se recubrieron las placas a 4 °C durante toda la noche y se prolongó el recubrimiento a la temperatura ambiente durante 1 hora el día siguiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS/0.05% de Tween-20 y se bloquearon con un 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Se diluyó VHH 15A9 purificado hasta 3 µg/mL en MPBS al 1%/0.5% de Tween y se añadió a la placa recubierta y se permitió la adhesión de VHH durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se detectaron los VHH unidos con incubaciones en serie con anticuerpos monoclonales de ratón contra la histidina (Abd Serotec) y anticuerpos de conejo de molécula completa contra IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en MPBS al 1%/0.05% de Tween-20. Se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido lavando tres veces con PBS/0.05% de Tween-20 después de cada incubación con el anticuerpo. Se lavaron las placas dos veces más con PBS y se añadieron 100 µL del sustrato pNPP-disodio hexahidratado (Sigma) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nM y el perfil de unión para VHH 15A9 obtenido se comparó con los anticuerpos de control (remítase a la Tabla 2). Se observaron patrones diversos y distintivos para VHH 15A9 y los anticuerpos de control. VHH 15A9 mostró una unión específica únicamente a la quitina.

Tabla 2: Especificidad de VHH que se une a la quitina en el ELISA

	VHH 15A9 que se unen de manera específica a la quitina	Condición de control sin VHH	Anticuerpo de control que se une de manera específica a la pectina	Unión del anticuerpo de control a la lectina de patata y la pectina
Recubrimiento de quitina	0.846	0.110	0.115	0.114
Recubrimiento de pectina	0.118	0.114	3.171	0.409
Recubrimiento de lectina de patata	0.114	0.112	0.118	3.878
Condición de control sin recubrimiento	0.109	0.111	0.111	0.116

Ejemplo 4: unión de VHH a microesferas de quitina

Unión de VHH a microesferas de quitina - Se analizaron VHH contra la quitina para determinar su unión a microesferas de quitina paramagnéticas (New England Biolabs). Se formaron estas microesferas mediante la química de emulsiones comenzando con quitosano con un peso molecular bajo y la encapsulación de las partículas de magnetita durante la formación de las microesferas. Una vez que se hubieron formado las microesferas, se acetilaron para garantizar que eran microesferas de quitina. Se equilibraron las microesferas con cinco lavados con NaCl 500 mM/Tris-HCl 20 mM/EDTA 1 mM/0.1% de Tween-20 utilizando una centrifuga magnética Dynamag (Invitrogen) y eliminando el sobrenadante pipeteando. Se dispensaron las microesferas equilibradas y se incubaron con 5 µg/mL de VHH contra la quitina etiquetado con histidina en BSA/PBS al 1% con una rotación cabeza sobre cabeza a 4 °C durante 2 horas. Las condiciones de control incluyeron incubaciones con VHH no relacionado en BSA/PBS al 1% o con BSA/PBS al 1% solo. Se eliminaron los VHH que no se habían unido mediante cinco lavados con PBS y se detectaron los VHH mediante incubaciones consecutivas con anticuerpos monoclonales de ratón contra la histidina (Abd Serotec) y anticuerpos de conejo de molécula completa contra IgG de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma). Se diluyeron los anticuerpos en BSA/PBS al 1% y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido lavando cinco veces con PBS entre las diferentes incubaciones. Después de los lavados finales y la eliminación del sobrenadante, se añadió el sustrato pNPP-disodio hexahidratado (Sigma) a cada condición y se incubó durante 10 minutos. Los sustratos se transfirieron a una placa óptica y se midió la absorbancia a 405 nm. La absorbancia medida fue de 4.0 (saturación), 3.8, 4.0 (saturación), 0.23 y 0.20 para VHH 15D1, VHH 15E4, VHH 15G2, VHH 15A9, VHH no relacionado e incubación sin VHH, respectivamente. En estos datos se aprecia que tras seleccionar y llevar a cabo

los cribados primarios con quitina de grado práctico VHH 15D1, VHH 15E4, VHH 15G2 y VHH 15A9 se unen realmente a la quitina.

Ejemplo 5: Unión de microcápsulas acopladas a VHH al polisacárido quitinoso inmovilizado

5 Con el objetivo de generar microcápsulas de poliurea funcionalizadas con VHH, se acoplaron los VHH a microcápsulas con un núcleo de un 1.5% de Uvitex OB (Ciba) en benzoato de bencilo y una cubierta con lisina incorporada para exponer en la superficie los grupos carboxilo. Se utilizó un núcleo de un 1.5% de Uvitex OB (Ciba) en benzoato de bencilo para la visualización fluorescente de las microcápsulas. Después de la producción de las microcápsulas, estas se lavaron con agua y se almacenaron como suspensiones de cápsulas en agua. Antes del acoplamiento de los VHH; se lavaron las microcápsulas con tampón MES/NaCl (MES 0.1 M/NaCl 0.5 M pH 6) utilizando una placa de filtración de 96 pocillos con pocillos profundos (Millipore) y un colector de vacío (Millipore). Se sometió a diálisis en el tampón MES/NaCl un conjunto de VHH, se añadió hasta una concentración final de 10-70 μM y se incubó con las microcápsulas durante 15-30 minutos. Se disolvió clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (Pierce) en tampón MES/NaCl y se añadió rápidamente hasta una concentración de 50 mM. Se acoplaron los VHH incubando con una mezcla continua a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se detuvieron las reacciones de acoplamiento añadiendo glicina o tampón Tris pH 7.5 hasta una concentración final de 100 mM y se incubó a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se recogieron los VHH que no se habían unido utilizando un formato con placa de filtración utilizando una placa colectora con pocillos profundos. Se lavaron las microcápsulas tres veces con PBS, se resuspendieron en PBS y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

20 Se utilizó un formato de ensayo de tipo ELISA para evaluar la interacción de las microcápsulas acopladas con VHH a las superficies que contenían polisacáridos quitinosos. Se recubrieron con quitina los pocillos de una microplaca en la que la mitad del área era de unión elevada (Greiner Bio-One). Se realizó el recubrimiento con quitina tal como anteriormente para los ELISA de titulación y especificidad. Como condición de control se recubrió con 100 $\mu\text{g/mL}$ de lectina de patata en PBS. Se lavaron las microplacas tres veces con PBS con 0.05% de Tween-20 y se bloquearon con un 5% de leche desnatada en PBS durante 2 horas. Se diluyeron las microcápsulas acopladas con VHH que contenían un trazador fluorescente hasta la densidad apropiada en un 1% de leche desnatada en PBS con un 0.05% de Tween-20. Se añadieron las microcápsulas en una dilución en serie a los pocillos recubiertos con quitina o de control y se permitió la adhesión durante 1 hora. Se eliminaron las microcápsulas que no se habían unido lavando cinco veces con PBS con un 0.05% de Tween-20. Se analizó el fondo de los pocillos de la placa de ELISA para determinar la fluorescencia utilizando un lector de microplacas multimodo (Tecan) para detectar las microcápsulas unidas (remítase a la Tabla 3).

Tabla 3: Uso de VHH para unir microcápsulas a polisacáridos quitinosos inmovilizados Se realizó un barrido en el fondo para analizar las microcápsulas con trazador fluorescente unidas a la quitina o las superficies recubiertas con el antígeno de control.

	Cantidad de microcápsulas	Microcápsulas con trazador fluorescente con VHH 15A9	Microcápsulas blanco sin VHH
Recubrimiento de quitina	100%	10621	2101
Recubrimiento de quitina	20%	985	356
Recubrimiento de quitina	4%	262	142
Recubrimiento de lectina de patata	100%	837	3206
Recubrimiento de lectina de patata	20%	581	645
Recubrimiento de lectina de patata	4%	157	212

35

Ejemplo 5: unión de microcápsulas, acopladas con VHH, a microesferas de quitina

Se estudió la unión de las microcápsulas acopladas con VHH a las microesferas magnéticas de quitina con microesferas paramagnéticas de quitina (New England Biolabs). Se equilibraron las microesferas con cinco lavados con NaCl 500 mM/Tris-HCl 20 mM/EDTA 1 mM/0.1% de Tween-20 utilizando una centrífuga magnética Dynamag (Invitrogen) y eliminando el sobrenadante pipeteando. Se dispensaron cantidades de microesferas de 1 mg y se calculó la concentración apropiada de microesferas a partir del diámetro de las microesferas (\varnothing 50-70 μm). Se incubaron las microesferas de quitina con un exceso de 100 veces de microcápsulas (\varnothing 10 μm) respecto al número de microesferas de quitina en un 1% de BSA en PBS y se permitió la adhesión durante 1 hora con una rotación

40

5 cabeza sobre cabeza a la temperatura ambiente. Las condiciones de control incluyeron incubaciones con microcápsulas blanco que no estaban acopladas con VHH. Se realizaron cinco lavados con PBS utilizando una rotación cabeza sobre cabeza para cada lavado y utilizando la centrifuga magnética Dynamag para recoger las microesferas entre cada etapa de lavado. Finalmente, se resuspendieron en un pequeño volumen las microesferas con microcápsulas unidas, se transfirieron a un microportaobjetos con 18 pocillos (Ibidi) y se analizaron para detectar microcápsulas unidas en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon). Se contaron las microcápsulas utilizando un software de análisis de imágenes Volocity (Perkin Elmer). Se utilizó un filtro DAPI para visualizar las microcápsulas Uvitex. Se detectaron $2.2E+03$ microcápsulas en 1 mg de las microesferas de quitina con microcápsulas acopladas con VHH 15D1. Únicamente se detectaron $7.1E+02$ microcápsulas en 1 mg de microesferas de quitina con microcápsulas blanco a las que no se les había acoplado VHH. Se obtuvo una unión
10 conveniente a las microesferas magnéticas de quitina con las microcápsulas con VHH acoplado que se une a la quitina.

REFERENCIAS

- Agdour, S. (2007) Production and characterization of the recombinant wheat chitinase Wch1 and generation of chitin-specific antibodies. Doctoral thesis Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- 5 - Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J.E., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. y Knox, J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 29321-29329.
- 10 - Bona, C. (1993). Molecular characteristics of anti-polysaccharide antibodies. *Springer Semin. Immunopathol.* 15, 103-118.
- Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., van Zonneveld, A.J. y Aerts, J.M.F.G. (1995). Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J. Biol. Chem.* 270, 26252-26256.
- Cisar, J., Kabat, E.A., Dorner, M.M. y Liao, J. (1975). Binding properties of immunoglobulin combining sites specific for terminal or nonterminal antigenic determinants in dextran. *J. Exp. Med.* 142, 435-459.
- 15 - Daley, L.P., Kutzler, M.A., Bennett, B.W., Smith, M.C., Glaser, A.L. y Appleton, J.A. (2010). Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to West Nile virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 239-246.
- De Simone, E.A., Saccodossi, N., Ferrari, A. y Leoni, J. (2008). Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (*Lama glama*) and assessment of the humoral immune response against different antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 64-73.
- 20 - Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *MAbs.* 1, 26-28.
- Dolk, E., van der Vaart, M., Hulsik, D.L., Vriend, G., de Haard, H., Spinelli, S., Cambillau, C., Frenken, L. y Verrips, T. (2005). Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 442-450.
- 25 - Dotan, I., Fiszman, S., Dgani, Y., Schwartz, M., Karban, A., Lemer, A., Weishauss, O., Spector, L., Shtevi, A., Altstock, R.T., Dotan, N. y Halpern, Z. (2006). Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serological markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 131, 366-378.
- Ferrandon, S., Sterzenbach, T., Mersha, F.B. y Xu, M.Q. (2003). A single surface tryptophan in the chitin-binding domain from *Bacillus circulans* chitinase A1 plays a pivotal role in binding chitin and can be modified to create an elutable affinity tag. *Biochim. Biophys. Acta* 1621, 31-40.
- 30 - Fipula, D. (2007). Antibody engineering and modification techniques. *Biomolecular Engineering* 24, 201-205.
- Folders, J., Tommassen, J., van Loon, L. y Bitter, W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1257-1263.
- Fritz, H.J., Hohlmaier, J., Kramer, W., Ohmayer, A. y Wippler, J. (1988). Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro. *Nucleic Acids Res.* 16, 6987-6999.
- 35 - Fritz, J. (2008). Cantilever biosensors. *Analyst* 133, 855-863.
- Guillen, D., Sanchez, S. y Rodriguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1241-1249.
- 40 - Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajjana Songa E., Bendahman, N. y Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448.
- Iseli, B., Boller, T. y Neuhaus, J.M. (1993). The N-terminal cysteine rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol.* 103, 221-226
- 45 - Itoh, Y., Kawase, T., Nikaido, N., Fukada, H., Mitsumi, M. Watanabe, T. e Itoh, Y. (2002). Functional analysis of the chitin binding domain of a family 19 chitinase from *streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1084-1092.
- Joshi, M.C., Sharma, A., Kant, S., Birah., A., Gupta, G.P., Khan, S.R., Bhatnagar, R. y Banjeree, N. (2008). An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. *J. Biol. Chem.* 283, 28287-28296.

- Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *FEBS J.* 275, 2684-2690.
- Mammen, M., Choi, S.K. y Whitesides, G.M. (1998). Polyvalent interaction in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 2754-2794.
- 5 - Marquette C.A. y Blum, L.C. (2006). State of the art and recent advances in immunoanalytical system. *Biosens. and Bioelectron.* 21, 1424-1433.
- Martin, R., Hild, S., Walther, P., Ploss, K, Boland, W. y Tomaschko, K.H. (2007). Granular chitin in the epidermis of nudibranch molluscs. *Biol. Bull.* 231, 307-315.
- 10 - Muyldermans, S., Cambillau, C. y Wyns, L. (2001). Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem. Sci.* 26, 230-235.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T. y Nagamatsu, Y. (2002). Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1301-1313.
- Neeraja, C., Moersbacher, B. y Podile, A.R. (2010a). Fusion of cellulose binding domain to the catalytic domain improves the activity and conformational stability of chitinase in *Bacillus licheniformis* DSM13. *Bioresour. Technol.* 101, 3635-3641.
- 15 - Neeraja, C., Subramanyam, R., Moerschbacher, B.M. y Podile, A.R. (2010b). Swapping the chitin-binding domain in Bacillus chitinases improves the substrate binding affinity and conformational stability. *Mol. Biosyst.* 6, 1492-1502.
- 20 - Nygren, P.A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.
- Saerens, D., Pellis, M., Loris, R., Pardon, E., Dumoulin, M., Matagne, A., Wyns, L., Muyldermans, S. y Conrath, K. (2005). Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* 352, 597-607.
- 25 - Sales, M.P., Pimenta, P.P., Paes, N.S., Grossi-de-Sa, M.F. y Xavier-Filho, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 27-34.
- Secondino, N.F.C., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M. y Pimenta, P.F.P. (2005). *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* 42, 928-938.
- 30 - Sendid, B., Dotan, N., Nseir, S., Savaux, C., Vandewalle, P., Standart, A., Zeimech, F., Guery, B.P., Dukler, A., Colombel, J.F. y Poulain, D., (2008). Antibodies against glucan, chitin and *Saccharomyces cerevisiae* mannan as new biomarkers of *Candida albicans* infection that complement tests based on *C. albicans* mannan. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1868-1877.
- Seow, C.H., Stempak, J.M., Xu, W., Lan, H., Griffiths, A.M., Greenberg, G.R., Steinhart, A.H., Dotan, N. y Silverberg, M.S. (2008). Two novel polysaccharide antibodies (anti-lainarin and anti-chitin) predict an aggressive Crohn's disease phenotype and improve differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 134, A-53 (abstract 391).
- 35 - Seow, C.H., Stempak, J.M., Xu, W., Lan, H., Griffiths, A.M., Greenberg, G.R., Steinhart, A.H., Dotan, N. y Silverberg, M.S. (2009). Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1426-1434.
- 40 - Shahidi F., Arachchi, J.K.V. y Jeon Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 37-51.
- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.
- 45 - Skottrup, P.D., Nicolaisen, M. y Justesen, A.F. (2008). Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 339-348.
- Stumpp, M.T., Binz, H.K. y Amstutz, P. (2008) DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 13, 695-701.

- Suetake, T., Tsuda, S., Kawabata, S., Miura, K., Iwanga, S., Hikichi, K., Nitta, K. y Kawano, K. (2000). Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. *J. Biol. Chem.* 275, 17929-17932.
- 5 - Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A. y Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognit.* 7, 9-24.
- Van der Linden, R.H.J., Frenken, L.G.J., de Geus, B., Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P. y Verrips, C.TR. (1999). Comparison of physical chemical properties of llama V_{HH} antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 37-46.
- 10 - Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F. y Koch-Nolte, F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157-174.
- 15 - Xu, M.Q., Paulus, H. y Chong, S. (2000). Fusions to self-splicing inteins for protein purification. *Methods Enzymol.* 326, 376-418.
- Yalpani, M., Johnson, F. y Robinson, L.E. (1992). Anti-microbial activity of some chitosan derivatives. In *Advances in chitin and chitosan*, Brine, C.J., Sanford, P.A. y Zikakis J.P. eds., Elsevier applied Science, Londres, UK, págs. 543-555.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> VIB VZW
 VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL
 Jongedijk, Erik

5 <120> Proteínas de unión al antígeno de polisacáridos
 <130> VIB/PEC/352b
 <150> US 61/402.307
 <151> 26-08-2010
 <150> EP 10175543.7

10 <151> 07-09-2010
 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 122

15 <212> PRT
 <213> Lama glama
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> 15A9

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(30)
 <223> FR1
 <220>

25 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

30 <222> (36)..(49)
 <223> FR2
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

35 <222> (50)..(66)
 <223> CDR2
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (67)..(98)
 <223> FR3

ES 2 646 744 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (99)..(111)

<223> CDR3

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (112)..(122)

<223> FR4

<400> 1

10 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ala Arg Thr Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
15 35 40 45

Ala Arg Ile Trp Trp Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

20 Leu Ser Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Pro Tyr Tyr Ser Ser Asp Gln Ser Gln Tyr Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
25 115 120

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> Lama glama

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<223> 15D1

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(30)
 <223> FR1

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (36)..(49)
 <223> FR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (50)..(66)
 <223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (67)..(98)

20 <223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (99)..(119)
 <223> CDR3

25 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (120)..(130)
 <223> FR4

<400> 2

30 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Leu Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val
 35 35 40 45

Ser Cys Leu Ser Ala Tyr Gly His Met Pro Arg Tyr Ala Asp Ala Val
 50 55 60

ES 2 646 744 T3

<222> (67)..(98)
<223> FR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

5 <222> (99)..(119)
<223> CDR3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (120)..(130)
<223> FR4

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Phe Leu Glu Tyr Tyr
15 20 25 30

Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ser Cys Leu Ser Ala Tyr Gly His Met Pro Arg Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Asn Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

25 Ala Arg Asn Cys Tyr Thr Thr Thr Gly His Gly Gly Thr Val Ile Arg
100 105 110

Ser Ser Thr Ser Ser Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

30 <210> 4
<211> 130
<212> PRT

<213> Lama glama
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <223> 15G2
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(30)
 <223> FR1
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (36)..(49)
 <223> FR2
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (50)..(66)
 20 <223> CDR2
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (67)..(98)
 <223> FR3
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (99)..(119)
 <223> CDR3
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (120)..(130)
 <223> FR4
 <400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 35 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Leu Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val

ES 2 646 744 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
5	ggtacgtgct gttgaactgt tcc	23
	<210> 8	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 8	
	gatgtgcagc tgcaggagtc tggrggagg	29
	<210> 9	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 9	
	ggactagtgc ggccgctgga gacggtgacc tgggt	35
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 10	
	ttatgcttcc ggctcgtatg	20
30	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador	
	<400> 11	
	ccacagacag ccctcatag	19

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión al antígeno derivada de un anticuerpo de camélido y que comprende una secuencia de VHH, donde dicha secuencia de VHH es capaz de unirse a un aminopolisacárido.
- 5 2. La proteína de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho aminopolisacárido es la quitina o el quitosano.
3. La proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicha proteína de unión al antígeno tiene actividad insecticida o fungicida.
4. La proteína de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína de unión al antígeno comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID N° 1 – SEQ ID N° 4.
- 10 5. El uso de una proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para determinar la presencia y/o concentración de un aminopolisacárido en una muestra.
6. El uso de una proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para aislar o purificar un aminopolisacárido a partir de una muestra.
- 15 7. Un agente de direccionamiento, capaz de unir un compuesto a un aminopolisacárido, donde dicho agente de direccionamiento comprende al menos una proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
8. El uso del agente de direccionamiento de acuerdo con la reivindicación 7 para dirigir un compuesto a un aminopolisacárido.
- 20 9. Una composición que comprende (i) al menos un agente de direccionamiento de acuerdo con la reivindicación 7 y (ii) uno o más compuestos.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha composición es una composición agroquímica.
11. Un método para mejorar la resistencia de una planta contra plagas de insectos y/o enfermedades fúngicas, comprendiendo dicho método al menos una aplicación de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-10 a la planta o a partes de la planta.
- 25 12. Una planta, transformada con un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.