

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 778**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2010** **PCT/CA2010/001489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011** **WO11035423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2010** **E 10818191 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2480560**

54 Título: **Método de preparación de proteínas derivadas de plantas**

30 Prioridad:

22.09.2009 US 244786 P

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

09.04.2018

73 Titular/es:

MEDICAGO INC. (100.0%)
1020 route de l'Eglise Suite 600
Québec, Québec G1V 3V9, CA

72 Inventor/es:

VEZINA, LOUIS-PHILIPPE;
COUTURE, MANON;
PAQUET, DANY;
DARGIS, MICHELE y
D'Aoust, MARC-ANDRE

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 662 778 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de preparación de proteínas derivadas de plantas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de proteínas derivadas de plantas. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos para obtener proteínas, incluyendo supraestructuras de proteínas, de plantas y tejidos vegetales.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las estrategias de expresión recombinante actuales en células huésped tales como *E. coli*, cultivo de células de insectos, y cultivo de células de mamíferos, expresan y secretan proteínas a un nivel muy alto en los medios de cultivo. Usando estos sistemas con altos niveles de expresión, se alcanza un plegamiento adecuado de proteínas y la modificación postraduccional de proteínas. Además, la purificación de la proteína expresada se simplifica ya que las proteínas intracelulares se pueden segregar fácilmente a partir de otros componentes (ADN, vesícula, membranas, pigmentos, etc.). Para los sistemas de expresión en plantas o levadura, la pared celular evita la secreción de la proteína expresada en los medios de cultivo.

20

Diferentes enfoques son ampliamente utilizados en la ciencia para generar extractos de células. Los enfoques mecánicos para alterar la pared celular y liberar su contenido generalmente no son selectivos para cierta clase de componentes celulares o proteicos. Dirigir la expresión de una proteína de interés en los medios de cultivo celular, permitiendo que los contaminantes intracelulares se eliminen por centrifugación o por filtración, permite el enriquecimiento sencillo y rápido de la proteína de interés. También puede ser deseable separar una proteína o una supraestructura de proteínas de interés, incluyendo rosetas proteicas, nanopartículas, grandes complejos proteicos, anticuerpos o partículas pseudovíricas (VLP), y similares, de algunas, o todas las proteínas, ADN, fragmentos de membrana, vesículas, pigmentos, carbohidratos, etc. presentes en la planta o materia vegetal antes de que se use la supraestructura de proteínas de interés en la formulación de la vacuna.

30

Las inmunoglobulinas (IgG) son proteínas heteromultiméricas complejas con afinidad característica para los homólogos antigénicos específicos de diversas naturalezas. En la actualidad, el aislamiento rutinario de las líneas celulares productoras de IgG y el advenimiento de tecnologías para la evolución dirigida por IgG y la ingeniería molecular han tenido un impacto profundo en su evolución como productos bioterapéuticos y en el mercado general de ciencias de la vida. La IgG monoclonal terapéutica (anticuerpos monoclonales, mAb) domina el mercado actual de nuevos fármacos antiinflamatorios y anticancerosos, y se encuentran actualmente cientos de nuevos candidatos en fase de investigación y desarrollo clínico para aplicaciones mejoradas o novedosas. La demanda anual de mercado de mAb varía de unos pocos gramos (diagnóstico), unos pocos kilogramos (antitoxina) hasta uno o varios cientos de kilogramos (biodefensa, anticanceroso, antiinfeccioso, antiinflamatorio). Los métodos para producir glucoproteínas modificadas a partir de plantas se describen en el documento WO 2008/151440.

40

Un método para extraer proteína del espacio intercelular de las plantas, que comprende un proceso de vacío y centrifugación para proporcionar un extracto fluido intersticial que comprende la proteína de interés, se describe en la Publicación PCT WO 00/09725 (de Turpen et al.). Este enfoque es adecuado para pequeñas proteínas (de 50 kDa o menores) que pasan a través de una red de microfibras bajo vacío y centrifugación, pero no es adecuado para proteínas más grandes, proteínas de superestructura, rosetas de proteínas, nanopartículas, complejos de proteínas grandes, tales como anticuerpos o VLP.

45

McCormick et al 1999 (Proc Natl Acad Sci USA 96: 703-708) describen el uso de un péptido señal de amilasa de arroz fusionado a un epítipo Fv de cadena sencilla (scFv) para dirigir la proteína expresada al compartimiento extracelular, seguido de infiltración al vacío de tejido de hoja y tallo para la recuperación de los polipéptidos scFv. Moehnke et al., 2008 (Biotechnol Lett 30: 1259-1264) describen el uso del método de infiltración al vacío de McCormick para obtener un alérgeno vegetal recombinante a partir de tabaco usando una extracción apoplásica. La Publicación PCT WO 2003/025124 (de Zhang et al) describe la expresión de inmunoglobulinas scFv en plantas, dirigiéndose al espacio apoplásico usando secuencias señal murinas. Fischer et al 1999 (J Imm Meth 226: 1-10) describen la purificación por afinidad de un anticuerpo de tamaño completo recombinante de un cultivo en suspensión de tabaco.

50

55

Las partículas pseudovíricas (VLP) se pueden emplear para preparar vacunas contra la influenza. Las

supraestructuras tales como VLP imitan la estructura de la cápside vírica, pero carecen de un genoma, y por lo tanto, no se pueden replicar ni proporcionan un medio para una infección secundaria. Las VLP ofrecen una alternativa mejorada para los antígenos recombinantes aislados (solubles) para estimular una fuerte respuesta inmunitaria. Las VLP se ensamblan tras la expresión de las proteínas víricas específicas y presentan una superficie externa que se asemeja a la de sus virus semejantes, aunque, a diferencia de la partícula vírica verdadera, no incorporan material genético. La presentación de antígenos en una partícula y una estructura multivalente similar a la del virus natural consigue una estimulación mejorada de la respuesta inmunitaria con componentes humorales y celulares equilibrados. Dicha mejora sobre la estimulación por los antígenos aislados se cree que será particularmente verdadera para los virus con envoltura ya que las VLP con envoltura presentan los antígenos superficiales en su estado unido a membrana natural (Grgacic y Anderson, 2006, *Methods* 40, 60-65). Además, las VLP de influenza, con su organización de nanopartículas, han demostrado ser mejores candidatos de vacuna en comparación con la hemaglutinina recombinante (HA) (es decir, HA monomérica, o HA organizada en rosetas; ensamblaje de 3-8 trómeros de HA), y son capaces de activar la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. (Bright, R.A., et. al., 2007, *Vaccine* 25, 3871-3878).

Las VLP de la influenza se han obtenido en células cultivadas de mamífero a partir de la co-expresión de la totalidad de 10 proteínas de influenza (Mena et al., 1996, *J. Virol.* 70, 5016-5024). Varias proteínas víricas se pueden distribuir para la producción de las VLP, y las VLP de la influenza en los programas para el desarrollo de vacunas se han producido a partir de la co-expresión de las 2 principales proteínas con envoltura antigénica (HA y NA) con M1 o a partir de la co-expresión de HA y M1 únicamente (Kang et al., 2009, *Virus Res.* 143, 140-146). Chen et al. (2007, *J. Virol.* 81, 7111-7123) han mostrado que la HA en solitario es capaz de dirigir la formación y brote de las VLP y la co-expresión de M1 se podría omitir en su sistema. Sin embargo, debido a que se encontró que la HA se une a glucoproteínas sialiladas sobre la superficie de las células mamíferas que producen las VLP, se co-expresó una sialidasa vírica para permitir la liberación de las VLP a partir de la producción de célula después del brote.

La Publicación PCT WO 2006/119516 (de Williamson y Rybicki) describe la expresión de H5 HA optimizada con codones humanos de longitud total y truncados de influenza A/Vietnam/1194/2004 en plantas. La construcción truncada carece del dominio de anclaje de la membrana. La mayor acumulación de la proteína HA se obtuvo con construcciones que se dirigen al ER. Las construcciones que carecen de un dominio dirigido a la membrana no produjeron una HA detectable. No se notificó la producción de VLP.

La producción de VLP de HA de influenza que comprenden una envoltura lipídica se ha descrito previamente por los inventores en los documentos WO 2009/009876 y WO 2009/076778 (de D'Aoust et al.). Para los virus con envoltura, puede ser ventajoso que una capa lipídica o membrana se retenga por el virus. La composición del lípido puede variar con el sistema (por ejemplo, un virus con envoltura producido en plantas incluirá lípidos vegetales o fitoesteroides en la envoltura), y puede contribuir a una respuesta inmunitaria mejorada.

El ensamblaje de las VLP con envoltura en tabaco transgénico que expresaba el antígeno superficial de HBV (HBsAg) se describió por Mason et al. (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11745-11749). Se mostró que las VLP de HBV producidas en plantas inducían potentes respuestas inmunitarias de linfocitos B y T en ratones cuando se administraron por vía parental (Huang et al., 2005, *Vaccine* 23, 1851-1858) pero la inmunización oral a través de estudios de alimentación sólo indujo una modesta respuesta inmunitaria (Smith et al., 2003, *Vaccine* 21, 4011-4021). Greco (2007, *Vaccine* 25, 8228-8240) mostró que los epítomos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en fusión con HBsAg se acumularon como VLP al expresarse en tabaco transgénico y *Arabidopsis*, creando una vacuna VLP bivalente.

La expresión de la proteína de cápside vírica (NVCP) en plantas transgénicas de tabaco y patata dio como resultado en el ensamblaje de las VLP sin envoltura (Mason et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5335-5340). Las VLP de la NVCP se han producido en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas (Huang et al. 2009, *Biotechnol. Bioeng.* 103, 706-714) y su inmunogenicidad tras la administración oral se demostró en ratones (Santi et al., 2008, *Vaccine* 26, 1846-1854). La administración de 2 o 3 dosis de patatas crudas que contenían 215-751 µg de NVCP en forma de las VLP a voluntarios adultos sanos dio como resultado el desarrollo de una respuesta inmunitaria en el 95 % de los voluntarios inmunizados (Tacket et al. 2000, *J. Infect. Dis.* 182, 302-305). Se han obtenido también VLP sin envoltura a partir de la expresión de antígeno central de HBV (HBcAg; Huang et al., 2009, *Biotechnol. Bioeng.* 103, 706-714), y la proteína L1 con cápside principal del virus de papiloma humano (HPV) (Varsani et al., 2003, *Arch. Virol.* 148, 1771-1786).

Por ejemplo, es deseable un sistema más simple de producción de proteínas, o de supraestructura de proteínas, que dependa de la expresión de una o algunas proteínas. La producción de proteínas, o supraestructuras de proteínas,

por ejemplo, pero sin limitación, rosetas proteicas, nanopartículas, grandes complejos proteicos tales como anticuerpos o VLP, en sistemas vegetales es ventajosa, ya que las plantas pueden cultivarse en un invernadero o campo, y no requieren métodos y manipulación de cultivo de tejidos asépticos.

- 5 Se desean métodos para preparar las proteínas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, que están sustancialmente libres de, o se separan fácilmente de las proteínas vegetales, que aún conservan la estructura y las características de la proteína.

RESUMEN DE LA INVENCION

10

El alcance de la invención se determina por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de proteínas derivadas de plantas. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos para obtener proteínas, incluyendo supraestructuras de

15

Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para preparar proteínas derivadas de plantas.

- La presente invención proporciona un método (A) para preparar proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o
- 20 proteínas de supraestructura, que comprende obtener una planta o materia vegetal que comprenda las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, localizadas dentro del apoplasto; producir una fracción de protoplastos y una fracción de apoplasto, comprendiendo la fracción de apoplasto proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura; y recuperar la fracción de apoplasto. El método puede comprender además una etapa de purificación de las proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, de la fracción de
- 25 apoplasto. Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden ser proteínas quiméricas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura. Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden ser heterólogas a la planta. Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden incluir una roseta proteica, un complejo proteico, un proteasoma, un metabolón, un complejo de transcripción, un complejo de recombinación, un complejo fotosintético, un complejo de
- 30 transporte de membrana, un complejo de poro nuclear, una nanopartícula proteica, una glucoproteína, un anticuerpo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal monocatenario, una partícula pseudovírica, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, una proteína de cápside viral, y una proteína de cubierta viral, una proteína quimérica, un complejo de proteína quimérica, una nanopartícula de proteína quimérica, una glucoproteína quimérica, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal quimérico, un
- 35 anticuerpo monoclonal quimérico monocatenario, una hemaglutinina quimérica, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, un virus proteína de la cápside, y una proteína de cubierta viral. El anticuerpo monoclonal derivado de planta puede comprender un anticuerpo monoclonal humano de ratón quimérico, por ejemplo, pero sin limitación, C2B8. Las VLP derivadas de plantas pueden comprender hemaglutinina de influenza.

- 40 Las fracciones de apoplasto y protoplasto se pueden producir mediante el tratamiento de la planta o materia vegetal por una composición enzimática. La composición enzimática comprende una o más de una celulasas, o una o más de una pectinasa, y una o más de una celulasas. Además, si se desea, la composición enzimática no incluye una lipasa o proteasa, o la composición no incluye una lipasa o proteasa añadida.

- 45 La planta o materia vegetal se puede obtener cultivando, recolectando y cultivando y recolectando la planta. La materia vegetal puede comprender parte o la totalidad de la planta, una o más de una hoja, tallo, o raíz.

La presente invención proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, como se ha descrito anteriormente (Método A), en el que un ácido nucleico que codifica las

50 proteínas, o proteínas de supraestructura, se introduce en la planta de manera transitoria. Como alternativa, el ácido nucleico se integra de forma estable dentro de un genoma de la planta.

- La presente invención proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, como se ha descrito anteriormente (Método A) que comprende además una etapa de purificar las
- 55 proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, de la fracción de apoplasto. La etapa de purificación puede comprender filtrar la fracción de apoplasto utilizando filtración en profundidad para producir un extracto clarificado, seguido de cromatografía del extracto clarificado utilizando una resina de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, o una combinación de los mismos.

Sin desear quedar ligado por la teoría, las proteínas obtenidas a partir del apoplasto son más homogéneas, ya que las formas intermedias de las proteínas modificadas postraduccionalmente, o las proteínas que comprenden otros tipos de procesamiento que se produce en diversos compartimentos intracelulares, por ejemplo, las mitocondrias, cloroplastos, y otros organelos, no se extraen conjuntamente. Un mayor grado de homogeneidad de una proteína recombinante típicamente da como resultado una mayor calidad de una preparación que comprende la proteína, y puede dar como resultado un producto con propiedades beneficiosas que incluyen mayor potencia, semivida más larga, o mejor capacidad inmunogénica. Por ejemplo, las proteínas sanguíneas que contienen alta glucosilación de manosa se eliminan en la circulación sanguínea más rápidamente que las proteínas que comprenden una glucosilación compleja. Una proteína glucosilada producida en la fracción apoplásica muestra glucosilación de tipo más compleja. Por lo tanto, una proteína derivada de apoplasto preparada utilizando los métodos descritos en el presente documento, que implican digestión de la pared celular, muestra, por ejemplo, una mejor semivida en circulación.

Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, pueden incluir rosetas de proteínas, complejos proteicos, nanopartículas de proteínas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, VLP. Las VLP pueden comprender uno o más polipéptidos HA de influenza. La proteína de supraestructura puede ser una proteína de supraestructura quimérica, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, o el polipéptido HA de influenza, puede ser un polipéptido HA quimérico. Si la proteína de supraestructura es una VLP, entonces la VLP derivada de plantas puede comprender además actividad hemaglutinante. La planta o materia vegetal se puede obtener cultivando, recolectando y cultivando y recolectando la planta. La materia vegetal puede comprender parte o la totalidad de la planta, una o más de las hojas, tallos, o raíces.

La presente invención también proporciona un método (C) de preparación de proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, que comprende obtener una planta o materia vegetal que comprende proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, digerir la materia vegetal usando una composición enzimática degradante de la pared celular para producir una fracción digerida, y filtrar la materia digerida para producir una fracción filtrada y recuperar las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada.

La composición enzimática comprende una o más de una celulasa, o una o más de una pectinasa, y una o más de una lipasa. Además, si se desea, la composición enzimática no incluye una lipasa o proteasa, o la composición no incluye una lipasa o proteasa añadida. La proteína de supraestructura derivada de plantas puede ser una proteína de supraestructura quimérica derivada de plantas. La supraestructura de proteínas derivadas de plantas pueden incluir una roseta proteica, un complejo proteico, un proteasoma, un metabolón, un complejo de transcripción, un complejo de recombinación, un complejo fotosintético, un complejo de transporte de membrana, un complejo de poro nuclear, una nanopartícula proteica, una glucoproteína, un anticuerpo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal monocatenario, una partícula pseudovírica, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, una proteína de cápside viral, y una proteína de cubierta viral, una proteína quimérica, un complejo de proteína quimérica, una nanopartícula de proteína quimérica, una glucoproteína quimérica, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal quimérico monocatenario, una hemaglutinina quimérica, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, un virus proteína de la cápside, y una proteína de cubierta viral. El anticuerpo monoclonal derivado de planta puede comprender un anticuerpo monoclonal humano de ratón quimérico, por ejemplo, pero sin limitación, C2B8. Las VLP derivadas de plantas pueden comprender hemaglutinina de influenza.

La presente invención proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, como se ha descrito anteriormente (Método B), en el que un ácido nucleico que codifica las proteínas, o proteínas de supraestructura, se introduce en la planta de manera transitoria. Como alternativa, el ácido nucleico se integra de forma estable dentro de un genoma de la planta.

La presente invención proporciona un método para preparar VLP derivadas de plantas como se ha descrito anteriormente (Método B) que comprende además una etapa de separación de las proteínas, o proteínas de supraestructura, en la fracción filtrada de los desechos celulares y materiales insolubles. La etapa de separación puede realizarse por centrifugación, por filtración en profundidad, o bien por centrifugación y filtración en profundidad para producir una fracción clarificada. Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, pueden purificarse adicionalmente por cromatografía, por ejemplo, el extracto clarificado puede purificarse usando una resina de intercambio catiónico, una resina de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, o una combinación de los mismos.

Las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, pueden incluir rosetas de proteínas, complejos

proteicos, nanopartículas de proteínas, glucoproteínas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, VLP. Las VLP pueden comprender uno o más polipéptidos HA de influenza. La proteína de supraestructura puede ser una proteína de supraestructura quimérica, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, o el polipéptido HA de influenza, puede ser un polipéptido HA quimérico. Si la proteína de supraestructura es una VLP, entonces la VLP derivada de plantas puede comprender además actividad hemaglutinante.

Sin desear quedar ligado por la teoría, las VLP hechas de plantas que comprenden lípidos derivados de plantas, pueden inducir una reacción inmunitaria más fuerte que las VLP hechas en otros sistemas de fabricación y que la reacción inmune inducida por estas VLP hechas de plantas es más fuerte cuando se compara con la reacción inmune inducida por vacunas de virus enteros vivos o atenuados.

La composición de un extracto de proteína obtenido de una célula huésped es un complejo y típicamente comprende componentes intercelulares e intracelulares, junto con una proteína o supra-estructura de interés que se aislará. La preparación de una fracción apoplásica, seguida de una etapa para segregar las proteínas intracelulares y los componentes es ventajosa ya que la proteína o supra-estructura de interés se puede enriquecer y aumentar la eficiencia dentro de un proceso de fabricación. Teniendo un proceso más sencillo, que comprende menos etapas eficientes, puede dar como resultado aumentos significativos de rendimiento y reducción de costes. También se ha encontrado que el proceso de digerir la pared celular utilizando enzimas para degradación de la pared celular aumenta el rendimiento de la proteína de supraestructura incluso si los protoplastos no permanecen intactos durante el procedimiento de extracción. Sin desear quedar ligado a la teoría, la etapa de digestión de la pared celular puede separar los componentes poliméricos de la pared células y ayudar en la liberación de las proteínas, o proteínas de supraestructura, asociadas de otra manera dentro de la pared celular. Este protocolo también puede minimizar la contaminación de las proteínas, o proteínas de supraestructura, dentro de los componentes intracelulares.

Se conocen métodos para digerir la pared celular de la planta, y las mezclas de cóctel enzimático que digieren las paredes celulares pueden variar.

Los métodos descritos en el presente documento dan como resultado menos interrupción, y contaminación de un extracto de proteína de supraestructura derivada de plantas en comparación con métodos para preparar una proteína de supraestructura derivada de plantas que implica homogeneización, mezcla o molienda. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan una fracción apoplásica del tejido vegetal y que puede mantener la integridad de los protoplastos y sus componentes. El método como se describe en el presente documento es eficaz en la purificación de proteínas, o proteínas de supraestructura, incluso si los protoplastos, o una parte de los protoplastos, pierden su integridad y ya no están intactos.

Estos métodos proporcionan un mayor rendimiento de las proteínas, o proteínas de supraestructura, en comparación con métodos de extracción de proteínas de supraestructura que implican técnicas de alteración tisular estándar, por ejemplo, homogeneización, mezcla o molienda. El mayor rendimiento puede ser debido, en parte, a una reducción de las fuerzas de cizallamiento que alteran la integridad estructural de las proteínas, o proteínas de supraestructura, y en el caso de las VLP, la envoltura lipídica. La preparación de proteínas, o proteínas de supraestructura, a partir de una fracción apoplásica puede ser ventajosa, ya que las fracciones apoplásicas están significativamente reducidas, o libres de, proteínas citoplásmicas. Por lo tanto, la separación de la proteína de supraestructura de otras proteínas y materia, incluyendo monómeros, dímeros, trímeros, o fragmentos de la proteína de supraestructura, en la fracción apoplásica se realiza fácilmente. Sin embargo, también se pueden obtener rendimientos aumentados de las proteínas, o proteínas de supraestructura, usando los métodos descritos en el presente documento, incluso si la preparación de protoplastos, o una parte de la preparación de protoplastos, no está intacta.

Las glucoproteínas, incluyendo glucoproteínas de supraestructura, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que se secretan en el apoplasto comprenden un mayor porcentaje de N-glicanos que han completado su maduración y comprenden residuos de N-acetilglucosamina o galactosa terminales (N-glicanos complejos), en comparación con los métodos de extracción que no digieren la pared celular, por ejemplo, las plantas extraídas del mezclador. Se ha encontrado que las glucoproteínas de supraestructura, por ejemplo anticuerpos monoclonales, que comprenden N-glicanos complejos presentan la propiedad beneficiosa de una semivida aumentada en el flujo sanguíneo en comparación con los anticuerpos monoclonales que comprenden residuos de manosa terminales (N-glicanos inmaduros).

Usando la digestión enzimática de la pared celular, puede ser posible liberar un grupo de anticuerpos apoplásicos que comprende N-glicanos que han completado su maduración. Este método de extracción puede permitir la recuperación de una población enriquecida, o una población homogénea de anticuerpos glicosilados que llevan N-

glicanos complejos, separando las formas inmaduras de los anticuerpos glicosilados en la fracción de protoplasto. Si se desea el grupo de anticuerpos que llevan N-glicanos inmaduros, la fracción de protoplasto se puede retener y los anticuerpos se pueden purificar a partir de la fracción de protoplasto.

- 5 Las VLP de la presente invención también se caracterizan por presentar una mayor actividad de hemaglutinación que las obtenidas usando técnicas estándar de alteración tisular. Esta actividad hemaglutinante mejorada puede ser resultado de un mayor rendimiento de las VLP intactas (menos monómeros o trímeros de HA libres en solución), un mayor rendimiento de las VLP intactas con envolturas lipídicas intactas, o una combinación de los mismos.
- 10 Las vacunas fabricadas usando VLP proporcionan la ventaja, en comparación con vacunas hechas de virus enteros, de que no son infecciosas. Por lo tanto, la contención biológica no es un problema y no es necesaria para la producción. Las VLP hechas de plantas proporcionan una ventaja adicional al permitir que el sistema de expresión se cultive en un invernadero o en un campo, siendo así significativamente más económico y adecuado para mayor escala.
- 15 Adicionalmente, las plantas no comprenden enzimas implicadas en la síntesis y adición de residuos de ácido siálico a proteínas. Las VLP pueden producirse en ausencia de neuraminidasa (NA), y no hay necesidad de coexpresar NA, ni de tratar las células productoras o extraer con sialidasa (neuraminidasa), para asegurar la producción de VLP en plantas.
- 20 Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 Estas y otras características de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La **Figura 1** muestra una representación esquemática del casete de expresión basado en CPMVHT (construcción 685) para la expresión de la hemaglutinina H5 A/Indonesia/5/05.

- 30 La **Figura 2** muestra A) la secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO.1) de una porción de construcción para expresar H5/Indo (construcción número 685) desde PacI (aguas arriba del promotor 35S) hasta AscI (inmediatamente aguas abajo del terminador NOS). La secuencia de codificación de H5 de A/Indonesia/5/2005 está subrayada. La **Figura 2B** muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 2) de hemaglutinina H5 A/Indonesia/5/05 codificada por la construcción número 685.

- 35 La **Figura 3** muestra la caracterización de las estructuras que contienen hemaglutinina (HA) por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Después de la centrifugación del extracto de la planta digerida, el sedimento se suspendió de nuevo y se fraccionó por SEC. La **Figura 3A** muestra el contenido de proteína soluble total por fracción (triángulos de color negro; % del eje Y máximo del lado izquierdo; determinado usando el método de Bradford). También se muestra la actividad hemaglutinante de las fracciones recogidas (barras de color negro; eje Y en el lado derecho). La **Figura 3B** muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones eluidas con SEC. Las fracciones se precipitaron con acetona y se volvieron a suspender en 1/40 de volumen de tampón de carga de muestra reductor antes del análisis. El gel se tiñó con una solución al 0,1 % Coomassie R-250. Las VLP purificadas se realizaron como control. La banda correspondiente al monómero HA0 se indica mediante una flecha. PM - Patrones de peso molecular (kDa); C - VLP purificadas (control); los carriles 7 a 10 y 14 a 16 corresponden a las fracciones numéricas eluidas del análisis SEC, mostrado en la Figura 3A.

- 40 La **Figura 4** muestra una comparación de los perfiles proteicos obtenidos después de la digestión enzimática y por homogeneización mecánica usando un homogeneizador Comitrol™. Las muestras se trataron en tampón de carga de muestra desnaturante y las proteínas se separaron por análisis SDS-PAGE de las fracciones de elución. Los geles se tiñeron con una solución al 0,1 % de Coomassie R-250. PM - Patrones de peso molecular (kDa); carril 1 - 25 µl de mezcla enzimática; carril 2 - 25 µl de digestión enzimática de tejido vegetal, y carril 3 - 5 µl de extracto obtenido con el homogeneizador Comitrol.

- 50 La **Figura 5** muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 9) de un casete de expresión de HA que comprende promotor de plastocianina de alfalfa y 5' UTR, secuencia codificante de hemaglutinina H5 de A/Indonesia/5/2005 (Construcción n.º 660), plastocianina de alfalfa 3' UTR y secuencias de terminación.

- 55 La **Figura 6** muestra la captura de HA-VLP en una resina de intercambio catiónico que forma directamente la separación de HA-VLP en la fracción apoplásica. Las muestras se trataron en tampón de carga de muestra desnaturante y no reductor y las proteínas se separaron por SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con una solución al 0,1 % de Coomassie R-250. Carril 1: Fracción apoplásica después de la centrifugación,

Carril 2-3: Fracción apoplásica después de la microfiltración sucesiva; Carril 4: Carga del intercambio catiónico; Carril 5: Flujo a través de una fracción del intercambio catiónico. Carril 6; elución de intercambio catiónico, concentrado 10X; Carril 7: Patrones de peso molecular (kDa).

La **Figura 7** muestra el perfil del análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de VLP H5/Indo (**Figura 7A**) y VLP H1/Cal (**Figura 7B**) después de la clarificación sin adición de NaCl al tampón de digestión y de VLP H1/Cal (**Figura 7C**) con esta adición. Los experimentos de NTA se llevaron a cabo con NanoSight LM20 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido). El instrumento está equipado con un láser azul (405 nm), una cámara de muestra y una junta tórica de fluoroelastómero Viton. Los vídeos se grabaron a temperatura ambiente y se analizaron usando el software NTA 2.0. Las muestras se registraron durante 60 s. El obturador y la ganancia se escogieron manualmente de manera que se obtuviera una resolución de partícula óptima.

La **Figura 8** muestra una transferencia de Western del extracto de VLP H3/Brisbane generado por digestión enzimática usando diferentes tampones. Carril 1) Estándar de HA recombinante puro (5 µg, de Immune Technology Corp. IT-003-0042p) Carril 2 a 5: Contienen 7 µl de extracto enzimático centrifugado realizado en los siguientes tampones: Carril 2) Manitol 600 mM + citrato 125 mM + NaPO₄ 75 mM + EDTA 25 mM + bisulfito al 0,04 % pH 6,2, Carril 3) Manitol 600 mM + citrato 125 mM + NaPO₄ 75 mM + EDTA 50 mM + bisulfito al 0,04 % pH 6,2, Carril 4) Manitol 200 mM + citrato 125 mM + NaPO₄ 75 mM + EDTA 25 mM + bisulfito al 0,03 % pH 6,2, Carril 5) Manitol 200 mM + citrato 125 mM + NaPO₄ 75 mM + EDTA 50 mM + bisulfito al 0,03 % pH 6,2. La flecha representa la señal de inmunodetección de HAO.

La **Figura 9** muestra la secuencia del fragmento de ADN sintetizado para el conjunto de la construcción N.º 590 (fragmento LC; (SEQ ID NO.15).

La **Figura 10** muestra la secuencia del fragmento de ADN sintetizado para el conjunto de la construcción N.º 592 (fragmento HC; (SEQ ID NO.16).

La **Figura 11A** y la **Figura 11B** muestran representaciones esquemáticas de las construcciones N.º 595 (Figura 11A) y N.º R472 (Figura 11B), respectivamente.

Figure 12 Comparación por SDS-PAGE de anticuerpos purificados de extractos producidos por interrupción mecánica (extracción del mezclador) y digestión enzimática de las paredes celulares. Para cada método de extracción, se procesaron dos lotes fueron y se purificaron de forma independiente.

La **Figura 13A** muestra una comparación de la proporción de N-glicanos oligomannosídicos en C2B8 purificado por interrupción mecánica (extracción del mezclador) y digestión enzimática de las paredes celulares. La **Figura 13B** muestra una comparación de la proporción de N-glicanos complejos en C2B8 purificado por interrupción mecánica (extracción del mezclador) y digestión enzimática de las paredes celulares.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a métodos para la preparación de proteínas derivadas de plantas. Más específicamente, la presente invención proporciona métodos para obtener proteínas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, de plantas y tejidos vegetales.

La siguiente descripción es de una realización preferida.

La presente invención proporciona un método para obtener una proteína o supra-estructura de proteína de interés. La proteína de interés puede estar presente en el compartimento de apoplasto o extracelular, que corresponde a la porción de célula de planta excluyendo el compartimento de protoplastos/esferoplastos. El método consiste en eliminar, digerir o tanto digerir como eliminar la pared celulósica de la célula vegetal que rodea las células vegetales. Mediante la digestión de la pared celular, se separan los componentes poliméricos de la pared celular, y la proteína o proteínas, o proteínas, o proteínas de supraestructura, de interés puede liberarse más fácilmente. Utilizando este método, la proteína o proteínas, o proteínas, o proteínas de supraestructura de interés, se enriquecen ya que el compartimento de protoplastos/esferoplastos que contiene una mayor parte de las proteínas y componentes de la célula huésped se segrega del apoplasto. Como se indica a continuación, el método, como se proporciona en el presente documento, sigue siendo eficaz en la obtención de una proteína, o supraestructura de proteína o proteína de interés si, durante el proceso, se pierde la integridad del compartimiento de protoplastos/esferoplastos, si el compartimento de protoplastos/esferoplastos no está intacto, y si una porción de las proteínas de la célula huésped y los componentes del compartimento de protoplastos/esferoplastos están presentes en la fracción apoplásica. Usando los métodos descritos a continuación, si se pierde la integridad del compartimiento de protoplastos/esferoplastos, la proteína o la supraestructura de proteínas puede separarse aún de los orgánulos intactos, incluyendo las mitocondrias, los cloroplastos y otros orgánulos, y aún se pueden obtener resultados beneficiosos.

Por "proteína" o "proteína de interés" (estos términos se usan de manera intercambiable), se refiere a una proteína, o subunidad de proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, o región codificante, que se debe expresar dentro de una planta o porción de la planta. Las proteínas pueden tener un peso molecular de aproximadamente 1 a 5 aproximadamente 100 kDa o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 kDa, o cualquier cantidad entre las mismas. Una proteína puede ser monomérica, dimérica, trimérica o multimérica.

Una supraestructura de proteínas, también denominada proteína de supraestructura, o superestructura de proteínas, 10 o proteína de superestructura, es una estructura de proteínas compuesta por dos o más polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser iguales o diferentes; si son diferentes, pueden estar presentes en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1 o mayor. Las proteínas de supraestructura, pueden incluir, pero sin limitación, rosetas proteicas, complejos proteicos, nanopartículas proteicas, glucoproteínas, anticuerpos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales monocatenarios o partículas pseudovíricas, 15 proteasomas, metabolones, complejos de transcripción, complejos de recombinación, complejos fotosintéticos, complejos de transporte de membrana, complejos de poros nucleares, proteínas quiméricas, complejos de proteínas quiméricas, nanopartículas de proteínas quiméricas, glucoproteínas quiméricas, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monoclonales quiméricos, anticuerpos monoclonales monocatenarios quiméricos o hemaglutinina quimérica (HA). Si la supraestructura de proteínas es una VLP, la VLP puede seleccionarse del grupo de proteínas de envoltura vírica, 20 proteínas de estructura vírica, proteínas de cápside vírica, y proteínas de cubierta vírica. Las VLP derivadas de plantas pueden comprender influenza (HA).

Típicamente, una supraestructura de proteínas (superestructura de proteínas), cuando se ensambla, es grande, por ejemplo, tiene un peso molecular mayor de 75 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 75 a aproximadamente 1500 25 kDa o cualquier peso molecular entre los mismos. Por ejemplo, la supraestructura de proteínas puede tener un peso molecular de aproximadamente 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500 kDa, o cualquier cantidad entre los mismos. Las subunidades que se combinan para formar la supraestructura de proteínas pueden ser de un peso molecular 30 menor, por ejemplo, cada subunidad que tiene una molécula peso de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 500 kDa, o cualquier cantidad entre los mismos. Una supraestructura de proteínas puede comprender una proteína que presenta una estructura secundaria, con uno o más aminoácidos unidos por hidrógeno, por ejemplo con residuos en hélices de proteínas, una estructura terciaria, que tiene una configuración tridimensional, o una estructura cuaternaria que tiene una disposición de múltiples proteínas plegadas o moléculas de proteína en espiral 35 que forman un complejo de subunidades múltiples.

Un complejo multiproteico (o un complejo proteico) puede comprender un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Si las diferentes cadenas polipeptídicas contienen diferentes dominios proteicos, entonces el complejo multiproteico resultante puede tener múltiples funciones catalíticas. El complejo proteico también puede 40 ser un polipéptido multienzimático, que comprende múltiples dominios catalíticos dentro de una única cadena polipeptídica. Los complejos proteicos están típicamente en forma de estructura cuaternaria. Los ejemplos de complejos proteicos que típicamente no pueden sobrevivir intactos usando protocolos estándar de aislamiento de proteínas, pero que pueden obtenerse usando los métodos descritos en el presente documento incluyen proteasomas (para la degradación de péptidos y proteínas), metabolones (para producción de energía oxidativa), 45 ribosomas (para síntesis de proteínas; por ejemplo, como se describe en Pereira-Leal, J.B.; et. al., 2006, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.,361(1467):507-517), complejos de transcripción, complejos de recombinación, complejos fotosintéticos, complejos de transporte de membrana, complejos de poro nuclear. El presente método puede usarse para obtener complejos proteicos que se caracterizan por tener interacciones de dominio de proteína- 50 dominio de proteína estables o más débiles.

Los ejemplos de una proteína, o una supraestructura de proteína, incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, una enzima industrial, por ejemplo, celulasas, xilanasas, proteasas, peroxidasa, subtilisina, un suplemento proteico, un producto nutracéutico, un producto de valor añadido, o fragmento del mismo para alimentación, alimento, o tanto como uso en pienso como en comida, una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo, pero sin limitación, 55 factores de crecimiento, reguladores del crecimiento, anticuerpos, antígenos y fragmentos de los mismos, o sus derivados útiles para inmunización o vacunación y similares. Las proteínas de interés adicionales pueden incluir, pero sin limitación, interleucinas, por ejemplo, una o más de IL-1 a IL-24, IL-26 e IL-27, citocinas, eritropoyetina (EPO), insulina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o combinaciones de los mismos, interferones, por ejemplo, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gama, factores de coagulación sanguínea, por ejemplo, Factor VIII, Factor

IX o tPA hGH, receptores, agonistas de receptores, anticuerpos, neuropéptidos, insulina, vacunas, factores de crecimiento, por ejemplo, pero sin limitación, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento de transformación, reguladores del crecimiento, antígenos, autoantígenos, fragmentos de los mismos, o combinaciones de los mismos.

5

Un ejemplo no limitante de una supraestructura de proteínas es un anticuerpo. Los anticuerpos son glucoproteínas que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 kDa, o cualquier cantidad entre las mismas. Los anticuerpos comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, que están conectadas por enlaces disulfuro. Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, cada cadena ligera puede tener un peso molecular de aprox. 25 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 kDa, o cualquier cantidad entre los mismos, o más, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 300 kDa, o cualquier cantidad de los mismos, y se compone por dos dominios, un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L). Cada cadena pesada puede tener un peso molecular de aprox. 50 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 75 kDa, o cualquier cantidad entre los mismos, o más, por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 500 kDa, o cualquier cantidad de los mismos, y consiste en una región constante y variable. Las cadenas pesada y ligera contienen varias secciones homólogas que consisten en grupos similares pero no idénticos de secuencias de aminoácidos. Estas unidades homólogas consisten en aproximadamente 110 aminoácidos y se llaman dominios de inmunoglobulina. La cadena pesada contiene un dominio variable (V_H) y tres o cuatro dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 , y C_H4 , dependiendo de la clase o isotipo del anticuerpo). La región entre los dominios C_H1 y C_H2 se denomina región bisagra y permite flexibilidad entre los dos brazos Fab de la molécula de anticuerpo con forma de Y, lo que les permite abrirse y cerrarse para alojar la unión a dos determinantes antigénicos separados por una distancia fija.

Otro ejemplo no limitante de una supraestructura de proteínas es una VLP. La VLP puede comprender una forma precursora HA0, o los dominios HA1 o HA2 retenidos juntos por puentes disulfuro. Una VLP puede tener un tamaño promedio de aproximadamente 20 nm a 1 μ m, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150 160, 170, 180, 190 o 200 nm, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo 100 nm, y pueden incluir una membrana lipídica.

Las proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden comprender además uno o más lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, membranas o similares. Dos o más polipeptidos pueden estar conectados por un enlace covalente, un puente disulfuro, interacción de carga, atracción hidrófoba, fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno o similares. Un ejemplo de una supra-estructura de proteínas es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal monocatenario, o una partícula pseudovírica (VLP), que puede estar envuelta, o no envuelta, por ejemplo, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural vírica, una proteína de cápside viral, o una proteína de cubierta viral.

Las proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden producirse en células huésped adecuadas, incluyendo células huésped vegetales, y si se desea, se purifican adicionalmente. Mientras que en el presente documento se ilustran un anticuerpo monoclonal quimérico, una VLP de influenza y una VLP de influenza quimérica, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para cualquier proteína citosólica derivada de planta o proteína de supraestructura, o cualquier proteína derivada de planta o proteína de supraestructura que se localice, o se secrete, en el apoplasto.

La presente invención también proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura. El método implica obtener una planta o materia vegetal que comprende proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, localizadas dentro del apoplasto; producir una fracción de protoplastos/esferoplastos, y una fracción de apoplasto de la materia vegetal, comprendiendo la fracción de apoplasto proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, y recuperar la fracción de apoplasto. Si se desea, las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, pueden purificarse a partir de la fracción apoplásica.

La presente invención también proporciona un método para preparar una proteína o proteína de supraestructura, en el que la proteína o proteína de supraestructura comprende una envoltura lipídica derivada de planta, por ejemplo, una VLP que comprende una envoltura lipídica derivada de planta. El método incluye obtener una planta, o materia vegetal que comprende la proteína de supraestructura de interés, por ejemplo, la VLP, tratar la planta o materia vegetal con una composición enzimática para producir uno o más de un complejo proteico apoplásico y una fracción de protoplastos/esferoplastos, y separar el uno o más de un complejo de proteína apoplásico de la fracción de protoplastos. El uno o más de un complejo proteico apoplásico comprenden la proteína de supraestructura o VLP

que comprenden una envoltura lipídica derivada de plantas.

La presente invención también proporciona un método de preparación de proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, que comprende obtener una planta o materia vegetal que comprende las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, digerir la materia vegetal usando una composición enzimática degradante de la pared celular para producir una fracción digerida, y filtrar la materia digerida para producir una fracción filtrada y recuperar las proteínas derivadas de plantas, o proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada. En este método, la integridad de los protoplastos puede no ser necesaria.

- 10 Un protoplasto es una célula vegetal de la que se ha eliminado completa o parcialmente su pared celular. Un esferoplasto puede tener una eliminación parcial de la pared celular. Se puede usar un protoplasto, un esferoplasto o tanto un protoplasto como un esferoplasto (protoplasto/esferoplasto) como se describe en el presente documento, y los términos como se usan en el presente documento, son intercambiables. La pared celular puede ser desintegrada y eliminada mecánicamente (por ejemplo, a través de homogeneización, mezcla), la pared celular puede ser digerida
15 enzimáticamente total o parcialmente, o la pared celular puede ser eliminada usando una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos, por ejemplo, homogeneización seguida de tratamiento con enzimas para la digestión de la pared celular.

- Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales del cultivo de tejidos vegetales, células vegetales cultivadas y producción de protoplastos, esferoplastos y similares, incluyen: Introduction to Plant Tissue Culture, by MK Razdan 2ª Ed. (Science Publishers, 2003), o véase, por ejemplo, la siguiente URL: molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm. Los métodos y técnicas relacionados con la producción y manipulación de protoplastos (o esferoplastos) se revisan, por ejemplo, en Davey MR et al., 2005 (Biotechnology Advances 23: 131-171).
20 Los trabajos de referencia estándar que exponen los métodos y principios generales de bioquímica proteica, biología molecular y similares incluyen, por ejemplo, Ausubel et al, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1998 y Suplementos hasta 2001); Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, 1989; Kaufman et al , Eds., Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine, CRC Press, Boca Raton ,1995; McPherson, Ed., Directed
30 Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1991.

- Las enzimas útiles para digerir o degradar paredes celulares vegetales para liberación de protoplastos o esferoplastos se conocen por un experto en la técnica y pueden incluir celulasa (EC 3.2.1.4), pectinasa (EC 3.2.1.15), xilanasas (EC 3.2.1.8), quitinasas (EC 3.2.1.14), hemicelulasa, o una combinación de las mismas. Los
35 ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen una mezcla enzimática de múltiples componentes que comprende celulasa, hemicelulasa y pectinasa, por ejemplo MACEROZYME™ (que contiene aproximadamente: Celulasa: 0,1 U/mg, Hemicelulasa: 0,25 U/mg, y Pectinasa: 0,5 U/mg). Se enumeran otros ejemplos de enzimas comerciales, mezclas enzimáticas y proveedores en la Tabla 1 (véase: Introduction to Plant Tissue Culture, de MK Razdan 2ª Ed., Science Publishers, 2003).

- 40 Los nombres alternativos y los tipos de celulasas incluyen endo-1,4-β-D-glucanasa; β-1,4-glucanasa; β-1,4-endoglucano hidrolasa; celulasa A; celulosina AP; endoglucanasa D; álcali celulasa; celulasa A 3; celudextrinasa; 9.5 celulasa; avicelasa; pancelasa SS y 1,4-(1,3;1,4)-β-D-glucan 4-glucanohidrolasa. Los nombres alternativos y los tipos de pectinasas (poligalacturonasas) incluyen pectina despolimerasa; pectinasa; endopoligalacturonasa;
45 pectolasa; pectina hidrolasa; pectina poligalacturonasa; endo-poligalacturonasa; poli-α-1,4-galacturónido glicanohidrolasa; endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa y poli(1,4-α-D-galacturónido) glicanohidrolasa. Los nombres alternativos y los tipos de xilanasas incluyen hemicelulasa, endo-(1→4)-β-xilan 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasas; xilanasas; β-1,4-xilanasas; endo-1,4-xilanasas; endo-β-1,4-xilanasas; endo-1,4-β-D-xilanasas; 1,4-β-xilan xilanohidrolasa; β-xilanasas; β-1,4-xilan xilanohidrolasa; endo-1,4-β-xilanasas; β-D-xilanasas. Los nombres alternativos
50 y los tipos de quitinasas incluyen quitodextrinasa; 1,4-β-poli-N-acetilglucosaminidasa; poli-β-glucosaminidasa; β-1,4-poli-N-acetil glucosaminidasa; poli[1,4-(N-acetil-β-D-glucosaminida)] glicanohidrolasa.

Tabla 1: Ejemplos no limitantes de enzimas disponibles en el mercado para aislamiento de protoplastos

Enzima	Fuente	Proveedor
Celulasas		
Celulasa ONOZUKA R-10	<i>Trichoderma viride</i>	Kinki Yakult Mfg. Col. Ltd. 8-12, Shingikancho Nishinomiya, Japón
Celulasa ONOZUKA RS	<i>T. viride</i>	Yakult Honsha Co., Tokio, Japón

Celulasa YC	<i>T. viride</i>	Seishin Pharma Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama Nagareyama-shi, Chiba-kan, Japón
Celulasa CEL	<i>T. viride</i>	Cooper Biomedical Inc. Malvern, PA, Estados Unidos
Celulisina	<i>T. viride</i>	Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos
Driselasa	<i>Irpex locteus</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokio, Japón
Melcelasa P-1	<i>T. viride</i>	Meiji Seiki Kaisha Ltd. N.º 8, 2-Chome Kyobashi, Chou-Ku, Japón
Multifect CX GC	<i>T. viride</i>	Genencor
Multifect CX B	<i>T. viride</i>	Genencor
Hemicelulasas		
Helicasa	<i>Helix pomatia</i>	Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers, Francia
Hemicelulasa	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos
Hemicelulasa H-2125	<i>Rhizopus</i> sp.	Sigma, Munich
Rhozyme HP 150	<i>Aspergillus niger</i>	Genencor Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos
Pectinasas		
MACERASE	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos
MACEROZYME R-10	<i>R. arrhizus</i>	Yakult Honsha Co., Tokio, Japón
Multifect Pectinasa FE	<i>A. niger</i>	Genencor
PATE	<i>Bacillus polymyza</i>	Farbwerke-Hoechst AG, Frankfurt, FRG
Pectinol	<i>Aspergillus</i> sp.	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Filadelfia, PA 19105, Estados Unidos
Pectoliasa Y-23	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharma Co. Ltd., Japón
Zimoliasa	<i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma Chemical Co., Estados Unidos

La elección de una enzima particular o combinación de enzimas, y las condiciones de concentración y reacción pueden depender del tipo de tejido vegetal utilizado del que se obtiene la fracción protoplástica y apoplástica que comprende las VLP. Se puede usar una mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, por ejemplo, una pectinasa MACEROZYME™ o Multifect, en una concentración que varía del 0,01 % al 2,5 % (v/v), por ejemplo, el 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o el 2,5 % (v/v), o cualquier cantidad entre las mismas. Puede usarse MACEROZYME™ o Multifect en solitario, o en combinación con otras enzimas, por ejemplo, celulasa, pectinasa, hemicelulasa, o una combinación de las mismas. La celulasa se puede usar en una concentración que varía del 0,1 % al 5 %, por ejemplo, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 3,75, 4,0, 4,25, 4,5, 4,75, 5,0 % (p/v) o cualquier cantidad entre las mismas.

La solución enzimática (como alternativa denominada composición degradante de pared celular, solución de digestión) comprenderá generalmente un tampón o sistema de tampón, un agente osmótico, y una o más de una sales, cationes divalentes u otros aditivos. El tampón o sistema de tampón se selecciona para mantener un pH en el intervalo adecuado para la actividad enzimática y la estabilidad de la(s) proteína(s), o VLP, para purificar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente 8,0, o cualquier entre los mismos. El pH seleccionado puede variar dependiendo de la VLP a recuperar, por ejemplo, el pH puede ser 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, o cualquier pH entre los mismos. Los ejemplos de tampones o sistemas de tampón incluyen, pero sin limitación, MES, fosfato, citrato y similares. Uno o más tampones o sistemas de tampón pueden combinarse en una solución enzimática (solución de digestión); el uno o más tampones pueden estar presentes en una concentración de 0 mM a aproximadamente 200 mM, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o 190 mM o cualquier cantidad entre las mismas. Dependiendo de la idoneidad, se puede añadir un componente osmótico si se desea. El agente osmótico y su concentración se seleccionan para elevar la resistencia osmótica de la solución enzimática. Los ejemplos de agente osmótico incluyen manitol, sorbitol u otros alcoholes de azúcar, polietilenglicol (PEG) de diferentes longitudes de polímero, y similares. Los intervalos de concentración del agente osmótico pueden variar dependiendo de la especie de la planta, el tipo de agente osmótico usado, y el tipo de tejido vegetal seleccionado (especie u órgano de origen, por ejemplo, hoja o tallo) - generalmente el intervalo es de 0 M a aproximadamente 0,8 M, por ejemplo 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, o 0,75 M, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo, manitol 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 nM, o cualquier cantidad entre las mismas. La concentración de agente osmótico también se puede expresar como un porcentaje (p/v). Para algunos tipos de plantas o tejidos, puede ser beneficioso emplear una preparación ligeramente hipertónica, que puede facilitar la separación de la membrana plasmática de células vegetales de la pared celular. El agente osmótico también se puede omitir durante la digestión.

35

Otro parámetro a establecer para la digestión de la planta es la temperatura. La temperatura puede controlarse si se desea durante el proceso de digestión. El intervalo de temperatura útil debe estar entre 4 °C y 40 °C o cualquier temperatura entre las mismas, por ejemplo de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 15 °C, o cualquier cantidad entre las mismas, o de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 22 °C, o cualquier temperatura entre las mismas. Dependiendo de la temperatura elegida, los otros parámetros experimentales de la digestión pueden ajustarse para mantener condiciones óptimas de extracción.

- Se pueden añadir cationes, sales o ambos para mejorar la estabilidad de la membrana plasmática, por ejemplo cationes divalentes, tales como Ca^{2+} , o Mg^{2+} , a 0,5-50 mM, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo, CaCl_2 , NaCl , CuSO_4 , KNO_3 , y similares, de aproximadamente 0 a aproximadamente 750 mM, o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 o 750 mM. También pueden añadirse otros aditivos incluyendo un quelante, por ejemplo, pero sin limitación, EDTA, EGTA, de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 mM, o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mM o cualquier cantidad entre la misma, un agente reductor para evitar la oxidación tal como, pero sin limitación, bisulfito sódico o ácido ascórbico, a 0,005-0,4 % o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4 %, o cualquier cantidad entre la misma, inhibidores enzimáticos específicos (véase más adelante), y si se desea, un inhibidor de la senescencia foliar, por ejemplo, cicloheximida, cinetina, o una o más poliaminas.
- La solución de digestión puede comprender también uno o más de manitol de aproximadamente 0 a aproximadamente 600 mM, NaCl de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 mM, EDTA de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 mM, celulasa de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % v/v, pectinasa de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 1 % v/v, metabisulfito sódico de aproximadamente el 0,03 a aproximadamente el 0,04 %, citrato de aproximadamente 0 a aproximadamente 125 mM o NaPO_4 de aproximadamente 0 a 75 mM.

- La materia vegetal puede tratarse para mejorar el acceso de las enzimas o de la composición enzimática a la pared celular de la planta. Por ejemplo, la epidermis de la hoja puede ser retirada o "pelada" antes del tratamiento con una composición enzimática. La materia vegetal puede ser cortada en pedazos pequeños (manualmente, o con un dispositivo de trituración o corte como una máquina de cortar Urschel); la materia vegetal cortada puede infiltrarse adicionalmente con una composición enzimática bajo un vacío parcial (Nishimura y Beevers 1978, *Plant Physiol* 62: 40-43; Newell et al., 1998, *J. Exp Botany* 49: 817-827). La perturbación mecánica de la materia vegetal también puede aplicarse a los tejidos vegetales (Giridhar et al., 1989, *Protoplasma* 151: 151-157) antes o durante el tratamiento con una composición enzimática.

- Puede ser deseable utilizar una composición enzimática que carezca, o que tenga lipasas o proteasas inactivadas. En algunas realizaciones, uno o más inhibidores de proteasa, o lipasa pueden incluirse en la composición enzimática. Los ejemplos de inhibidores de lipasa incluyen RHC80267 (SigmaAldrich); los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen E-64, Na_2EDTA , Pepstatina, aprotinina, PMSF, Pefabloc, Leupeptina, bestatina y similares.

- Se puede usar cualquier método adecuado para mezclar o agitar la materia vegetal en la composición enzimática. Por ejemplo, la materia vegetal puede girarse o agitarse suavemente en una bandeja o recipiente o a través de un agitador rotatorio, cayendo en un tambor giratorio u oscilante. Se debe tomar precaución para minimizar el daño a los protoplastos (y/o esferoplastos) hasta que se eliminan de la sopa de digestión. El recipiente de digestión debe seleccionarse en consecuencia.

- Como ejemplo no limitativo, se puede usar una composición de enzima que comprende celulasa al 1,5 % (Onozuka R-10) y MACEROZYME™ al 0,375 % en manitol 500 mM, CaCl_2 10 mM y MES 5 mM (pH 5,6) para la producción de protoplastos (o esferoplastos) a partir de algunos tejidos de *Nicotiana*. Como se describe en el presente documento, la concentración de manitol también se puede variar de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 mM, o cualquier cantidad entre la misma. Un experto en la técnica, provisto con la información descrita en el presente documento, será capaz de determinar una composición enzimática adecuada para la edad y cepa del *Nicotiana sp.*, o para otra especie utilizada para la producción de VLP.

- Tras la alteración de la pared celular, o la digestión parcial de la pared celular, se obtienen una fracción de protoplastos (que comprende protoplastos y/o esferoplastos) y una "fracción de apoplasto". Como alternativa, se puede obtener una "fracción digerida". Como se indica a continuación, la integridad de la fracción de protoplastos puede no ser necesaria para producir altos rendimientos de proteína como se describe en el presente documento, por lo tanto, se puede usar una fracción de apoplasto o una fracción digerida para la extracción de proteínas, por

ejemplo, pero sin limitación, VLP, proteínas de envoltura viral, proteínas estructurales virales, proteínas de cápside viral, proteínas de cubierta viral.

Por "fracción de apoplasto" se refiere a una fracción que se obtiene después de digestión enzimática, o digestión enzimática parcial, utilizando enzimas de degradación de la pared celular de la materia vegetal en presencia de un agente osmótico y/u otros ingredientes que pueden usarse para facilitar el mantener la integridad del protoplasto. La fracción de apoplasto puede comprender algunos componentes que surgen de protoplastos alterados (o esferoplastos). Por ejemplo, la fracción de apoplasto puede comprender de aproximadamente el 0 a aproximadamente el 50 % (v/v) o cualquier cantidad entre la misma, de los componentes de la fracción de protoplastos, o el 0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o el 50 % (v/v) o cualquier cantidad entre las mismas, de los componentes de la fracción de protoplastos.

Por "fracción digerida" se refiere a la fracción que permanece después de la digestión enzimática, o digestión enzimática parcial, utilizando enzimas de degradación de la pared celular de la materia vegetal, sin embargo, no se requiere la integridad del protoplasto y la fracción digerida puede comprender intactos, alterados, o tanto protoplastos intactos como alterados. La composición que comprende las enzimas de degradación de la pared celular utilizadas para producir la fracción digerida puede comprender un agente osmótico, o el agente osmótico puede estar presente en una cantidad reducida cuando se compara con la cantidad presente en procedimientos estándar usados para obtener protoplastos, o el agente osmótico puede estar ausente de la composición. La fracción digerida comprende la fracción de apoplasto y la fracción de protoplastos/esferoplastos, sin embargo, la fracción de protoplastos/esferoplastos puede estar o no intacta. La fracción digerida contiene componentes intracelulares y componentes extracelulares. Los componentes intracelulares se pueden encontrar en forma de protoplastos/esferoplastos si se usa un agente osmótico para mantener intacto el protoplasto/esferoplasto. Si no se usa un agente osmótico en la solución de digestión, entonces los protoplastos/esferoplastos pueden ser alterados y los componentes intracelulares y extracelulares pueden combinarse en la fracción digerida. Como se describe en el presente documento, las proteínas de interés, o supraestructuras de proteínas de interés, pueden separarse de los componentes de la fracción digerida usando cualquier técnica adecuada. Sin desear quedar ligado a la teoría, la etapa de digestión de la pared celular puede separar los componentes poliméricos de la pared células y facilitar la liberación de las proteínas, o proteínas de supraestructura, atrapadas de otra manera dentro de la pared celular. Este protocolo también minimiza la contaminación de las proteínas, o proteínas de supraestructura, con los componentes intracelulares. Las proteínas o proteínas de supraestructura de interés pueden separarse de los restos celulares después de la digestión enzimática usando centrifugación a baja velocidad seguida de filtración, filtración en profundidad, sedimentación, precipitación, por ejemplo, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio, o una combinación de los mismos para obtener una fracción separada que comprende las proteínas o proteínas de supraestructura de interés.

Si se utiliza un agente osmótico, la fracción de protoplastos/esferoplastos, o fracción que comprende protoplastos, se puede separar de la fracción de apoplasto usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, filtración en profundidad, sedimentación, precipitación, o una combinación de los mismos para obtener una fracción separada que comprende las proteínas o proteínas de supraestructura de interés y/o que comprende protoplastos/esferoplastos que comprenden las proteínas o proteínas de supraestructura de interés.

La fracción separada puede ser, por ejemplo, un sobrenadante (si se centrifuga, sedimenta o precipita), o un filtrado (si se filtra), y se enriquece para proteínas, o proteínas de supraestructura. La fracción separada puede procesarse adicionalmente para aislar, purificar, concentrar, o una combinación de los mismos, las proteínas, o proteínas supraestructurales, por ejemplo, mediante etapas de centrifugación adicionales, precipitación, etapas cromatográficas (por ejemplo, exclusión de tamaño, intercambio iónico, cromatografía de afinidad), filtración de flujo tangencial, o una combinación de los mismos. La presencia de proteínas purificadas, o proteínas de superestructura, puede ser confirmada, por ejemplo, mediante un análisis Western nativo o SDS-PAGE, utilizando un anticuerpo de detección apropiado, electroforesis capilar, o cualquier otro método que será evidente para un experto en la técnica.

El apoplasto es la porción de la célula vegetal fuera de la membrana plasmática, e incluye la pared celular y los espacios intercelulares de la planta. Aunque se prefiere que la integridad de los protoplastos (y/o esferoplastos) se mantenga durante la digestión y el procesamiento adicional, no se requiere que los protoplastos permanezcan intactos para enriquecer las proteínas, o proteínas de supraestructura.

Durante la síntesis, las proteínas o las proteínas de supraestructura, pueden secretarse fuera de la membrana plasmática. Si la proteína de supraestructura es una VLP, tienen un tamaño promedio de aproximadamente 20 nm a 1 μ m, o cualquier cantidad entre los mismos. Si la proteína de supraestructura es un anticuerpo, tienen un peso

molecular de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1000 kDa, o cualquier cantidad entre los mismos. Debido a su tamaño, una vez sintetizadas, las proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden quedar atrapadas entre la membrana plasmática y la pared celular y pueden ser inaccesibles para aislamiento o purificación adicional usando métodos mecánicos estándar usados para obtener proteínas vegetales. Con el fin de maximizar los rendimientos, minimizar la contaminación de la fracción de proteínas de supraestructura con proteínas celulares, mantener la integridad de las proteínas, o proteínas de supraestructura y, cuando sea necesario, la envoltura o membrana lipídica asociada, pueden ser útiles métodos para alterar la pared celular para liberar las proteínas, o proteínas de supraestructura, que minimizan el daño mecánico al protoplasto y/o los esferoplastos, tales como los métodos enzimáticos descritos en el presente documento. Sin embargo, no se requiere que la integridad de todos los protoplastos se mantenga durante el procedimiento.

Una proteína de supraestructura, por ejemplo, una VLP producida en una planta puede complejarse con lípidos derivados de plantas. Los lípidos obtenidos de plantas pueden estar en forma de una bicapa lipídica, y pueden comprender además una envoltura que rodea la VLP. Los lípidos derivados de plantas pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta en la que se produce la VLP, incluyendo, pero sin limitación, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), glicosfingolípidos, fitoesteros o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteros se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, estigmasterol, sitosterol, 24-metilcolesterol y colesterol (Mongrand et al., 2004, J. Biol Chem 279: 36277-86).

La expresión polipeptídica puede dirigirse a cualquier espacio intracelular o extracelular, organelo o tejido de una planta según se desee. Con el fin de localizar el polipéptido expresado en una localización particular, el ácido nucleico que codifica el polipéptido puede estar enlazado a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal o una secuencia líder. Un péptido señal puede referirse como alternativa, como péptido de tránsito, secuencia señal, o secuencia líder. Los péptidos señal o secuencias peptídicas para dirigir la localización de un polipéptido expresado en el apoplasto incluyen, pero sin limitación, una secuencia señal o líder nativa (con respecto a la proteína), o una secuencia señal heteróloga, por ejemplo, pero sin limitación, un péptido señal de amilasa de arroz (McCormick 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 703-708), un péptido señal de proteína disulfuro isomerasa (PDI) que tiene la secuencia de aminoácidos:

MAKNVAIFGLLFSLLLLVPSQIFAE; SEQ ID NO. 10,

una proteína relacionada con la patogénesis de las plantas (PRP; Szyperski et al. PNAS 95: 2262-2262), por ejemplo, proteína 2 de la patogénesis de la planta del tabaco (PRP), un péptido señal de anticuerpo monoclonal humano (SP, o secuencia líder), o cualquier péptido señal que es nativo con respecto a la proteína.

En algunos ejemplos, un polipéptido expresado puede acumularse en un espacio intercelular o extracelular específico (tal como el apoplasto), organelo o tejido, por ejemplo, cuando el polipéptido se expresa y se secreta en ausencia de un péptido señal o péptido de tránsito.

La expresión "partícula pseudovírica" (VLP) o "partículas pseudovíricas" o "VLP" se refiere a estructuras que se autoensamblan y comprenden proteínas de superficie viral, por ejemplo, una proteína de HA de influenza, o una proteína de HA de influenza quimérica. Las VLP y las VLP quiméricas generalmente son morfológica y antigénicamente similares a los viriones producidos en una infección, pero carecen de información genética suficiente para replicarse y, por lo tanto, no son infecciosas.

Por "proteína quimérica" o "polipéptido quimérico", se refiere a una proteína o polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más de dos fuentes, por ejemplo, pero sin limitación, dos o más tipos o subtipos de influenza, que se fusionan como un solo polipéptido. La proteína o polipéptido quimérico puede incluir un péptido señal que es el mismo (es decir, nativo) como, o heterólogo con, el resto del polipéptido o proteína. La proteína quimérica o polipéptido quimérico puede producirse como un transcrito a partir de una secuencia de nucleótidos quimérica, y permanecer intacta, o si es necesario, la proteína quimérica o polipéptido quimérico puede escindirse después de la síntesis. La proteína quimérica intacta, o porciones escindidas de la proteína quimérica, pueden asociarse para formar una proteína multimérica. Una proteína quimérica o un polipéptido quimérico también puede incluir una proteína o polipéptido que comprende subunidades que están asociadas a través de puentes disulfuro (es decir, una proteína multimérica). Por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende secuencias aminoácidas de dos o más de dos fuentes puede procesarse en subunidades, y las subunidades pueden asociarse a través de puentes disulfuro para producir una proteína quimérica o un polipéptido quimérico. En un ejemplo no limitante, una proteína quimérica es un anticuerpo monoclonal quimérico, por ejemplo, C2B8, o una VLP quimérica,

por ejemplo, pero sin limitación, proteínas y construcciones producidas por VLP numeradas 690, 691, 696, 734, 737, 745 o 747 (Tabla 2) como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos US 61/220,161 y PCT/CA2010/000983.

5 La proteína o proteína de supraestructura puede ser una glucoproteína, y el método como se describe en el presente documento que implica la extracción por digestión de la pared celular se puede aplicar a las plantas que coexpresan una glucoproteína y una o más enzimas para modificar el perfil de N-glucosilación como se describe en el documento WO 20008/151440 (*Modifying glycoprotein production in plants*) para favorecer la recuperación de glucoproteínas portadoras de N-glicanos maduros modificados. Por ejemplo, los N-glicanos maduros podrían estar
10 exentos de residuos de xilosa y fucosa, o presentar N-glicanos reducidos fucosilados, xilosilados, o tanto fucosilados como xilosilados. Como alternativa, se puede obtener una proteína de interés que comprende un patrón de glucosilación modificado, en el que la proteína carece de fucosilación, xilosilación o ambas, y comprende aumento de la galactosilación.

15 El perfil de N-glucosilación modificado puede obtenerse coexpresando dentro de una planta, una porción de una planta, una secuencia de nucleótidos que codifica una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína híbrida (GNT1-GalT), que comprende un dominio CTS (es decir, la cola citoplásmica, dominio transmembrana, región del tallo) de N-acetilglucosaminil transferasa (GNT1) fusionada a un dominio catalítico de beta-1,4galactosiltransferasa (GalT), la primera secuencia de nucleótidos operativamente vinculada con una primera
20 región reguladora que está activa en la planta, y una segunda secuencia de nucleótidos para codificar la proteína de supraestructura de interés, la segunda secuencia de nucleótidos operativamente unida a una segunda región reguladora que es activa en la planta, y coexpresando la primera y segunda secuencias de nucleótidos para sintetizar una proteína de supraestructura de interés que comprende glicanos con el perfil de N-glucosilación modificado, como se describe en el documento WO 20008/151440.

25 La proteína de supraestructura puede ser hemaglutinina de influenza (HA), y cada una de las dos o más de dos secuencias de aminoácidos que forman el polipéptido puede obtenerse a partir de diferentes HA para producir una HA quimérica o HA de influenza quimérica. Una HA quimérica también puede incluir una secuencia de aminoácidos que comprende péptido señal heterólogo (una pre-proteína de HA quimérica) que se escinde después de la síntesis.
30 Los ejemplos de proteínas HA que pueden usarse en la invención descrita en el presente documento pueden encontrarse en los documentos WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico puede describirse como un "ácido nucleico quimérico", o una "secuencia de nucleótidos quimérica". Una partícula pseudovírica comprendida por HA quimérica puede describirse como una "VLP quimérica". Las VLP quiméricas se describen adicionalmente en la PCT N.º PCT/CA2010/000983, presentada el 25
35 de junio de 2010, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/220,161 (presentada el 24 de junio de 2009). Las VLP pueden obtenerse a partir de la expresión de HA nativo o quimérico.

La HA de las VLP preparadas de acuerdo con un método proporcionado por la presente invención, incluye secuencias conocidas y secuencias HA variantes que pueden desarrollarse o identificarse. Además, las VLP
40 producidas como se describen en el presente documento no comprenden neuraminidasa (NA) u otros componentes, por ejemplo M1 (proteína M), M2, NS y similares. Sin embargo, NA y M1 pueden coexpresarse con HA si se desean VLP que comprendan HA y NA.

Generalmente, el término "lípidos" se refiere a moléculas liposolubles (lipófilas), de origen natural. Una VLP quimérica
45 producida en una planta de acuerdo con algunos aspectos de la invención puede complejarse con lípidos obtenidos de plantas. Los lípidos obtenidos de plantas pueden estar en forma de una bicapa lipídica, y pueden comprender además una envoltura que rodea la VLP. Los lípidos obtenidos de plantas pueden comprender componentes lipídicos de la membrana plasmática de la planta, donde la VLP se produce, incluyendo, incluyendo, fosfolípidos, tri, di y monoglicéridos, así como un esteroles soluble en grasa o metabolitos que comprenden esteroles. Los ejemplos
50 incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol, fosfatidilserina, glicoesfingolípidos, fitoesteres o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípidos vegetal". Los ejemplos de fitoesteres incluyen campesterol, estigmaesterol, ergosterol, brasicesterol, delta-7-estigmaesterol, delta-7-avenaesterol, daunoesterol, sitoesterol, 24-metilcolesterol, colesterol o beta-sitoesterol (Mongrand et al., 2004, J. Biol Chem 279: 36277-86). Como entenderá fácilmente un experto en la
55 técnica, la composición lipídica de la membrana plasmática de una célula puede variar con el cultivo o las condiciones de crecimiento de la célula u organismo del que se obtiene la célula.

Las membranas celulares comprenden generalmente bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas funciones. Las concentraciones localizadas de lípidos particulares pueden encontrarse en la bicapa lipídica, denominada como

"balsas lipídicas". Estos microdominios de balsas lipídicas pueden estar enriquecidos con esfingolípidos y esteroides. Sin desear quedar ligado a la teoría, las balsas lipídicas pueden tener funciones importantes en la endo y exocitosis, la entrada o egreso de virus u otros agentes infecciosos, transducción de señal de inter-célula, la interacción con otros componentes estructurales de la célula u organismo, tales como matrices intracelulares y extracelulares.

5

Las VLP que comprenden una envoltura lipídica se han descrito previamente en los documentos WO 2009/009876; WO 2009/076778, y WO 2010/003225. Con referencia al virus de influenza, el término "hemaglutinina" o "HA", como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína estructural de partículas víricas de influenza. La HA de la presente invención puede obtenerse a partir de cualquier subtipo. Por ejemplo, la HA puede ser del subtipo H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, o H16, o de influenza tipos B o C. La HA recombinante de la presente divulgación también puede comprender una secuencia aminoacídica en base a la secuencia de cualquier hemaglutinina. La estructura de la hemaglutinina de influenza está bien estudiada y demuestra un alto grado de conservación en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Esta conservación estructural se observa a pesar de que la secuencia de aminoácidos puede variar (véase, por ejemplo, Skehel y Wiley, 2000 *Ann Rev Biochem* 69: 531-69; Vaccaro et al 2005). Las secuencias de nucleótidos que codifican HA son bien conocidas y están disponibles, por ejemplo, en la BioDefense and Public Health Database (ahora Influenza Research Database; Squires et al., 2008 *Nucleic Acids Research* 36: D497-D503) por ejemplo, en la URL: biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza) o las bases de datos mantenidas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI; por ejemplo, en la URL: ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=influenza).

La presente divulgación también pertenece a los métodos de preparación, aislamiento, o tanto preparación como aislamiento de VLP, incluyendo VLP de influenza de virus que infectan a seres humanos o animales huésped, por ejemplo, primates, caballos, cerdos, aves, ovejas, aves acuáticas, aves migratorias, codorniz, pato, ganso, aves de corral, pollos, camellos, caninos, perros, felinos, gatos, tigre, leopardo, civetas, visón, garduña, hurones, animales domésticos, ganado, ratones, ratas, focas, ballenas y similares. Algunos virus de la influenza pueden infectar más de un animal huésped. La variación de aminoácidos se tolera en hemaglutininas de virus de influenza. Esta variación proporciona nuevas cepas que se están identificando continuamente. La infectividad entre las nuevas cepas puede variar. Sin embargo, se mantiene la formación de trímeros de hemaglutinina, que posteriormente forman VLP. La presente invención también incluye métodos para preparar cualquier VLP derivada de plantas, independientemente del subtipo o secuencia de HA, o HA quimérico que comprende la VLP, o especie de origen.

El plegamiento correcto de la proteína de supraestructura puede ser importante para la estabilidad de la proteína, la formación de multímeros, la formación y función de la proteína. El plegamiento de una proteína puede estar influenciado por uno o más factores, incluyendo, pero sin limitación, la secuencia de la proteína, la abundancia relativa de la proteína, el grado de aglomeración intracelular, la disponibilidad de cofactores que pueden unirse o estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada, la presencia de una o más proteínas chaperona, o similares.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o proteínas de estrés son ejemplos de proteínas chaperonas, que pueden participar en diversos procesos celulares incluyendo síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención de plegado erróneo, prevención de agregación de proteínas, ensamblaje y desmontaje de complejos de proteínas, plegamiento de proteínas, y disgregación de proteínas. Los ejemplos de tales proteínas chaperonas incluyen, pero sin limitación, Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, ciclofilinas, ClpP, GrpE, ubiquitina, calnexina, y proteína disulfuro isomerasas (véase, por ejemplo, Macario, A.J.L., *Cold Spring Harbor Laboratory Res.* 25: 59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. *Ann. Rev. Genet.* 27: 437-496 (1993); Patente de Estados Unidos N.º 5.232.833). Pueden usarse proteínas chaperonas, por ejemplo, pero sin limitación, Hsp40 y Hsp70 para asegurar el plegamiento de una HA quimérica (Solicitud PCT N.º PCT/CA2010/000983 presentada el 15 de junio de 2010, y Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/220.161, presentada el 24 de junio de 2009; documentos WO 2009/009876 y WO 2009/076778). También puede usarse proteína disulfuro isomerasa (PDI; Acceso N.º Z11499).

Una vez recuperadas, las proteínas o proteínas de supraestructura, pueden evaluarse en cuanto a su estructura, potencia de tamaño o actividad, por ejemplo, pero sin limitación, mediante microscopía electrónica, dispersión de luz, cromatografía de exclusión por tamaño, HPLC, análisis de transferencia de Western, electroforesis, ELISA, ensayos basados en la actividad, por ejemplo ensayo de hemaglutinación, o cualquier otro ensayo adecuado. Estos y otros métodos para evaluar el tamaño, la concentración, la actividad y la composición de las VLP se conocen en la técnica.

Para la cromatografía de exclusión de tamaño preparativa, se puede obtener una preparación que comprende proteínas, o proteínas de supraestructura, mediante los métodos descritos en el presente documento, y el material insoluble se elimina por centrifugación. La precipitación con PEG o sulfato de amonio también puede ser beneficiosa. La proteína recuperada puede cuantificarse usando métodos convencionales (por ejemplo, ensayo 5 Bradford, BCA), y el extracto se pasa a través de una columna de exclusión de tamaño, utilizando por ejemplo SEPHACRYL™, SEPHADEX™, o medio similar, cromatografía usando una columna de intercambio iónico, o cromatografía usando una columna de afinidad, y se recogen las fracciones activas. Los complejos proteicos también se pueden obtener usando separación magnética basada en la afinidad, por ejemplo, con Dynabeads™ (Invitrogen), y eluyendo el complejo proteico de las Dynabeads™. También se puede usar una combinación de 10 protocolos cromatográficos y de separación. Después de la cromatografía, o la separación, las fracciones pueden analizarse adicionalmente mediante electroforesis de proteínas, inmunotransferencia, ELISA, ensayos basados en la actividad, según se desee, para confirmar la presencia de la proteína de supraestructura.

Si la proteína de supraestructura es una VLP, entonces se puede usar un ensayo de hemaglutinación para evaluar la 15 actividad hemaglutinante de las fracciones que contienen VLP, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Sin desear quedar unido a la teoría, la capacidad de HA de unirse a RBC de diferentes animales es impulsada por la afinidad de HA por los ácidos siálicos $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ y la presencia de estos ácidos siálicos en la superficie de RBC. La HA equina y aviar de los virus de la influenza aglutina los eritrocitos de todas las diversas especies, incluyendo pavos, pollos, patos, cobayas, seres humanos, ovejas, caballos y vacas; mientras que las AH humanas se unirán a 20 eritrocitos de pavo, pollos, patos, cobayas, seres humanos y ovejas (Ito T. et al, 1997, Virology, 227: 493-499; Medeiros R et al, 2001. Virology 289: 74-85).

También se puede utilizar un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI o HAI) para demostrar la eficacia de anticuerpos inducidos por una vacuna, o una composición de vacuna que comprende HA quimérica, o la VLP 25 quimérica puede inhibir la aglutinación de glóbulos rojos (RBC) por HA recombinante. Los títulos de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación de muestras de suero pueden evaluarse por HAI de microtítulo (Aymard et al 1973). Se pueden usar eritrocitos de cualquiera de varias especies - por ejemplo, caballo, pavo, pollo o similares. Este ensayo proporciona información indirecta sobre el ensamblaje del trímero de HA en la superficie de la VLP, lo que confirma la presentación adecuada de los sitios antigénicos en las HA.

30 Los títulos de HAI de reactividad cruzada también pueden usarse para demostrar la eficacia de una respuesta inmune a otras cepas de virus relacionadas con el subtipo de vacuna. Por ejemplo, el suero de un sujeto inmunizado con una composición de vacuna que comprende una hemaglutinina quimérica que comprende una HDC de un primer tipo o subtipo de influenza se puede usar en un ensayo de HAI con una segunda cepa de virus completo o 35 partículas de virus y se determina el título de HAI.

Las VLP de influenza preparadas mediante los métodos de la presente invención pueden usarse junto con una vacuna contra influenza existente para complementar la vacuna, hacerla más eficaz o reducir las dosis de administración necesarias. Como se conocerá por un experto en la técnica, la vacuna puede estar dirigida contra 40 uno o más de un virus de influenza. Los ejemplos de vacunas adecuadas incluyen, pero sin limitación, los comercialmente disponibles de Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi-Aventis, Serono, Shire Pharmaceuticals y similares. Si se desea, las VLP de la presente invención pueden mezclarse con un adyuvante adecuado como se conocerá por un experto en la técnica. Además, la VLP producida de acuerdo con la presente invención puede co-expresarse con otros componentes de 45 proteína o reconstituirse con otras VLP o componentes de proteína de influenza, por ejemplo, neuraminidasa (NA), M1 y M2. También puede co-expresarse o reconstituirse con otras VLP hechas de proteínas vacunales tales como antígenos de malaria, antígenos de VIH, antígenos del virus sincitial respiratorio (RSV) y similares.

Se establecen en la técnica métodos para la transformación, y regeneración de plantas transgénicas, células 50 vegetales, materia vegetal o semillas que comprenden proteínas, o proteínas de supraestructura, y se conocen por un experto en la técnica. El método para obtener plantas transformadas y regeneradas no es importante para la presente invención.

Por "transformación" se refiere a la transferencia interespecífica de información genética (secuencia de nucleótidos) 55 que se manifiesta genotípica, fenotípicamente, o ambas. La transferencia interespecífica de información genética de una construcción quimérica a un huésped puede ser hereditaria (es decir, estar integrada en el genoma del huésped) y la transferencia de información genética considerada estable, o la transferencia puede ser transitoria y la transferencia de información genética no es heredable.

Por la expresión "materia vegetal", se refiere a cualquier material obtenido a partir de una planta. La materia vegetal consiste en una planta completa, tejido, o cualquier fracción de la misma. Además, la materia vegetal puede comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de los mismos. Además, la materia vegetal consiste en plantas, tejido, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, de hojas, tallos, flores, frutos, raíces de la planta o una combinación de los mismos. La materia vegetal puede comprender una planta o porción de la misma que no ha sido sometida a ninguna etapa de procesamiento. Una porción de una planta puede comprender materia vegetal. Las plantas o materia vegetal pueden ser cosechadas u obtenidas por cualquier método, por ejemplo, se puede usar toda la planta, o las hojas u otros tejidos específicamente extraídos para uso en los métodos descritos. Las plantas transgénicas que expresan y secretan VLP también pueden usarse como material de partida para el procesamiento como se describe en el presente documento.

Las construcciones de la presente invención se pueden introducir en células vegetales usando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación, infiltración y similares. Para revisiones de tales técnicas, véanse, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nueva York VIII, págs. 421-463 (1988); Geierman y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2ª Ed. (1988); y Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2ª Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison-Wesley, Langmans Ltd. Londres, págs. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación de ADN directa, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo, usando protoplastos, microinyección, microproyectiles o triquitas, e infiltración al vacío. Véanse, por ejemplo, Bilang, et al. (*Gene* 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (*Plant Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser et al. (*Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell et al. (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch et al. (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., *Plant Physiology* 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonosoff (*J. Virol Meth.* 105: 343-348, 2002), Pat. de Estados Unidos N.º 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 6.403.865; 5.625.136).

Pueden usarse métodos de expresión transitoria para expresar las construcciones de la presente invención (véase Liu y Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105: 343-348).

Como alternativa, puede usarse un método de expresión transitoria a base de vacío, como se describe en las Publicaciones PCT WO 00/063400, WO 00/037663. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, un método de Agro-inoculación o Agro-infiltración, sin embargo, también pueden usarse otros métodos transitorios como se ha indicado anteriormente. Con la Agro-inoculación, o Agro-infiltración, una mezcla de *Agrobacterias* que comprende el ácido nucleico deseado entra en los espacios intercelulares de un tejido, por ejemplo, las hojas, la porción aérea de la planta (incluyendo el tallo, hojas y flores), otra porción de la planta (tallo, raíz, flores), o la planta completa. Después de cruzar la epidermis, las copias de t-ADN se transfieren e infectan de *Agrobacterium* a las células. El ADN-t se transcribe de manera episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en células infectadas, sin embargo, el pase de ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

Las secuencias descritas en el presente documento se resumen a continuación.

SEQ ID NO:	Descripción	Figura
1	Secuencia de ácido nucleico (construcción 685)	2A
2	Secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1	2B
3	pBinPlus.2613c: AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG	
4	Mut-ATG115.r: GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGT TGAAGATCGCTCACGCAAGAAAGACAAGAGA	
5	Mut-ATG161.c:	
	GTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAA CGTTTTCTTTCACTGAAGCGA	
6	LC-C5-1.110r: TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG	
7	Apal-H5 (A-Indo).1c:	

	TGTCGGGCCCCATGGAGAAAATAGTGC TTCTTCTTGCAAT	
8	H5 (A-Indo)-StuI.1707r: AAATAGGCCTTTAAATGCAAATTC TGCATTGTAACGA	
9	Secuencia de ácido nucleico (construcción 660)	5
10	Péptido señal PDI: MAKNVAIFGLLFSLLLLVPSQIFAE	
11	Plasto-443c	
12	supP 19-plasto.r	
13	supP19-1c	
14	SupP19-Sacl.r	
15	Fragmento LC de C2B8	9
16	Fragmento HC de C2B8	10

La presente invención se ilustrará en los siguientes ejemplos. Sin embargo, se entiende que estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos, y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

5

Ensamblaje de casetes de expresión

Las construcciones que pueden usarse para la producción de VLP se describen en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/220.161 y PCT/CA2010/000983, WO 2009/009876, WO 2009/076778 y WO2010/003225.

- 10 Las construcciones también pueden incluir los enumerados en la Tabla 2. El ensamblaje de estas construcciones se describe en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778, WO2010/003225 y US 61/220.161. Sin embargo, pueden usarse otras construcciones que comprenden HA conocidas, incluyendo, pero sin limitación, las proporcionadas en la Tabla 2, y combinadas con elementos reguladores y promotores similares o diferentes, para la producción de VLP como se describe en el presente documento.

15

Tabla 2: Ejemplos no limitantes de construcciones que pueden usarse para la producción de hemaglutinina

Casete número	HA correspondiente	Abreviatura de HA
540	SpPDI-H1 de la cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	H1/NC
560	SpPDI-H1 A/California/4/2009 en el casete de expresión de 2X35S/CPMV-HT	H1/Cal WT
580	SpPDI-H1 A/New Caledonia/20/99 en el casete de expresión de 2x35S/CPMV-HT	H1/NC
660	H5 de la cepa A/Indonesia/5/2005 (H5N1)	H1/Indo
663	H5 A/Indonesia/5/2005	H1/Indo
685	H5 A/Indonesia/5/2005 en el casete de expresión de CPMV-HT	H1/Indo
686	SpPDI-H5 A/Indonesia/5/2005 en el casete de expresión de CPMV-HT	H1/Indo
690	Dominio de unión al receptor (RB) de H1 A/Brisbane/59/07 en la cadena principal de H5 A/Indonesia/5/05	H1/Bris
691	H1 A/Brisbane/59/07 esterasa y dominios de unión al receptor (E1-RB-E2) en la cadena principal de H5 A/Indonesia/5/05	H1/Bris
696	Dominio de unión al receptor (RB) de H5 A/Indonesia/5/05 en la cadena principal de H1 A/New Caledonia/20/99	H1/Indo
732	H1 A/Brisbane/59/2007 en el casete de expresión de CPMV-HT	H1/Bris
733	SpPDI-H1 A/Brisbane/59/2007 en el casete de expresión de CPMV-HT	H1/Bris
734	Dominio de unión al receptor (RB) de H1 A/Brisbane/59/07 en la cadena principal de H5 A/Indonesia/5/05 en el casete de expresión de CPMV-HT	H1/Bris
735	H3 A/Brisbane/10/2007 en el casete de expresión de CPMV-HT	H3/Bris
736	SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 en el casete de expresión de CPMV-HT	H3/Bris
737	Ensamblaje de SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 quimérico (ectodominio) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + cola Cyto) en el casete de expresión de CPMV-HT	Quimera H3/Bris-H5/Indo
738	HA B/Florida/4/2006 en el casete de expresión de CPMV-HT	B/Flo

739	SpPDI-HA B/Florida/4/2006 en el casete de expresión de CPMV-HT	B/Flo
745	SpPDI-HA B/Florida/4/2006 (ectodominio) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + cola Cyto) en el casete de expresión de CPMV-HT	B/Flo
747	SpPDI-HA B/Florida/4/2006+ H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + cola Cyto) en el casete de expresión de 2X35S-CPMV-HT	B/Flo
774	HA de A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	H1/Bris
775	HA de A/Solomon Islands 3/2006 (H1N1)	H1/Solomon
776	HA de A/Brisbane 10/2007 (H3N2)	H3/Bris
777	HA de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	H3/Wisc
778	HA de B/Malaysia/2506/2004	B/Malaysia
779	HA de B/Florida/4/2006	B/Flo
780	HA de A/Singapore/1/57 (H2N2)	H2/Sing
781	HA de A/Anhui/1/2005 (H5N1)	H5/Anhui
782	HA de A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	H5/Vietnam
783	HA de A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1)	H6/HongKong
784	HA de A/Equine/Prague/56 (H7N7)	H7/Prague
785	HA de A/HongKong/1073/99 (H9N2)	H9/HongKong
787	H1 A/Brisbane/59/2007	H1/Bris
790	H3 A/Brisbane/10/2007	H3/Bris
798	HA B/Florida/4/2006	B/Flo

Los casetes de expresión de CPMV-HT incluían el promotor 35S para controlar la expresión de un ARNm que comprendía una secuencia codificante de interés flanqueada, en 5' por los nucleótidos 1-512 del RNA2 del virus del mosaico del caupí (CPMV) con ATG mutado en las posiciones 115 y 161 y en 3', por los nucleótidos 3330-3481 del RNA2 de CPMV (correspondientes a la 3' UTR) seguido del terminador de NOS. Se usó el plásmido pBD-C5-1LC, (Sainsbury et al. 2008; Plant Biotechnology Journal 6: 82-92 y Publicación PCT WO 2007/135480), para el ensamblaje de los casetes de expresión de hemaglutinina basados en CPMV-HT. La mutación de ATG en la posición 115 y 161 del RNA2 de CPMV se hizo usando un método de ligadura basado en PCR presentado en Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)). Se realizaron dos análisis por PCR separados usando pBD-C5-1LC como plantilla. Los cebadores para la primera amplificación fueron pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 3) y Mut-ATG115.r (SEQ ID NO: 4). Los cebadores para la segunda amplificación fueron Mut-ATG161.c (SEQ ID NO: 5) y LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6). Después, los dos fragmentos se mezclaron y se usaron como plantilla para una tercera amplificación usando pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 3) y LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6) como cebadores. El fragmento resultante se digirió con PacI y Apal y se clonó en pBD-C5-1LC digerido con la misma enzima. El casete de expresión generado se denominó 828.

Ensamblaje de H5 A/Indonesia/5/2005 en el casete de expresión de CPMV-HT (construcción número 685).

El ensamblaje de este casete se describe en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778 y WO2010/003325.

En resumen, la secuencia codificante de H5 de A/Indonesia/5/2005 se clonó en CPMV-HT como se indica a continuación: se añadieron los sitios de restricción Apal (inmediatamente aguas arriba del ATG inicial) y Stul (inmediatamente aguas abajo de un codón de terminación) a la secuencia codificante de hemaglutinina realizando una amplificación por PCR con los cebadores Apal-H5 (A-Indo).1c (SEQ ID NO: 7) y H5 (A-Indo)-Stul.1707r (SEQ ID NO: 8) usando la construcción número 660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnology Journal 6: 930-940 (2008)) como plantilla. La construcción 660 comprende un promotor de plastocianina de alfalfa y 5' UTR, secuencia codificante de hemaglutinina de H5 de A/Indonesia/5/2005 (Construcción n.º 660), plastocianina de alfalfa 3' UTR y secuencias de terminación (SEQ ID NO: 9; Figura 5). El fragmento resultante se digirió con enzimas de restricción Apal y Stul y se clonó en la construcción número 828, digerida previamente con las mismas enzimas. El casete resultante se denominó construcción número 685 (Figura 1, 2).

Supresores de silenciamiento

El silenciamiento del gen post-transcripcional (PTGS) puede estar implicado en la limitación de la expresión de los transgenes en plantas, y puede usarse la co-expresión de un supresor de silenciamiento del virus de patata Y (HcPro) para contrarrestar la degradación específica de ARNm de transgen (Brigneti y col., 1998). Los supresores alternos de silenciamiento se conocen bien en la técnica y se pueden usar como se describe en el presente

documento (Chiba et al., 2006, Virology 346:7-14), por ejemplo, pero sin limitación, TEV-p1/HC-Pro (virus de grabado del tabaco-pl/HC-Pro), BYV -p21, p19 de virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV p19), proteína de cápside del virus de oruga de tomate (TCV-CP), 2b de virus de mosaico de pepino; CMV-2b), p25 del Virus de patata X (PVX-p25), p11 del virus de patata M (PVM-p11), p11 del virus de patata S (PVS-p11), p16 del virus de quemadura de arándano, (BScV-p16), p23 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV-p23), p24 del virus-2 asociado con el enrollamiento de parra, (GLRaV-2 p24), p10 del virus A de parra, (GVA-p10), p14 del virus B de parra (GVB-p14), p10 del virus latente de *Heracleum* (HLV-p10), o p16 del virus latente común del ajo (GCLV-p16). Por lo tanto, un supresor de silenciamiento, por ejemplo, pero sin limitación, HcPro, TEV-p1/HC-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 o GVA-p10, puede co-expresarse junto con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés para asegurar además niveles altos de la producción de proteína en una planta.

La construcción de p19 se describe en el documento WO 2010/0003225. En resumen, la secuencia codificante de la proteína p19 del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV) se unió al casete de expresión de plastocianina de alfalfa mediante el método de ligación basado en PCR presentado en Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85(1995)). En una primera ronda de PCR, un segmento del promotor de plastocianina se amplificó usando los cebadores Plasto-443c:

GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC (SEQ ID NO:11)

20 y supP19-plasto.r

CCTTGATAGCTCGTTCCATTTTCTCTCAAGATG (SEQ ID NO:12)

25 con la construcción 660 (que se describe en el documento WO 2010/0003225) como plantilla. En paralelo, otro fragmento que contenía la secuencia codificante de p19 se amplificó con los cebadores supP19-1c

ATGGAACGAGCTATACAAGG (SEQ ID NO: 13)

30 y SupP19-Sacl.r

AGTCGAGCTCTTACTCGCTTTCTTTTTCGAAG (SEQ ID NO:14)

usando la construcción 35S:p19 como se describe en Voinnet et al. (The Plant Journal 33: 949-956 (2003)) como 35 plantilla. Después, los productos de amplificación se mezclaron y se usaron como plantilla para una segunda ronda de amplificación (reacción de ensamblaje) con los cebadores Plasto-443c y SupP19-Sacl.r. El fragmento resultante se digirió con BamHI (en el promotor de plastocianina) y SacI (en el extremo de la secuencia codificante de p19) y se clonó en la construcción número 660, digerida previamente con las mismas enzimas de restricción para dar la construcción número R472. Los plásmidos se usaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, 40 Manassas, VA 20108, Estados Unidos) por electroporación (Mattanovich et al., 1989). La integridad de todas las cepas de *A. tumefaciens* se confirmó mediante mapeo de restricción. La cepa de *A. tumefaciens* que comprende R472 (Figura 11B) se denomina "AGL1/R472".

Se preparó una construcción HcPro (35HcPro) como se describe en Hamilton y col. (2002). Todos los clones se 45 secuenciaron para confirmar la integridad de las construcciones. Los plásmidos se usaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, Estados Unidos) por electroporación (Mattanovich et al., 1989). La integridad de todas las cepas de *A. tumefaciens* se confirmó mediante mapeo de restricción.

Preparación de biomasa, inóculo, agroinfiltración, y cosecha de la planta

50 Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en llanos rellenados con un sustrato de musgo de turbera comercial. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero bajo un fotoperiodo 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales 55 bajo las mismas condiciones ambientales. Después de seis semanas, las plantas tenían un peso medio de 80 g y 30 cm de altura.

La cepa *Agrobacterium* AGL1 se transfectó (electroporación) con las construcciones como se identifican a continuación, usando los métodos descritos por D'Aoust et al 2008 (Plant Biotechnology Journal 6: 930-940). Se

cultivaron *Agrobacterium* transfectadas en medio YEB complementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 10 mM (MES), acetosiringona 20 µM, 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de carbenicilina pH 5,6 a una DO₆₀₀ entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se suspendieron de nuevo en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6).

5

Las plantas se agroinfiltraron como se describe en D'Aoust et al. (anteriormente). En resumen, para la infiltración al vacío, las suspensiones de *A. tumefaciens* se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en el medio de infiltración y se almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en 2,5 volúmenes de cultivo y se dejaron calentar antes de su uso. Las plantas enteras de *N. benthamiana* se pusieron invertidas en la suspensión bacteriana en un depósito de acero inoxidable estanco a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. A menos que se especifique otra cosa, todas las infiltraciones se realizaron como co-infiltración con una bacteria transformada con R472 (cepa AGL1/R472) a una relación 1:1. Tras la infiltración al vacío, las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 4-6 días hasta la cosecha.

15 Muestreo de hojas y extracción total de proteínas (homogeneización mecánica)

Después de la incubación de 4, 5, 6, 7 y 8 días, se recolectó la parte aérea de las plantas y se usó inmediatamente. Las proteínas solubles totales se extrajeron mediante homogeneización del tejido vegetal en 3 volúmenes de Tris 50 mM frío a pH 8,0, NaCl 0,15 M que contenía Triton X-100 al 1 % y metabisulfito sódico al 0,004 %. El tejido de la planta se homogeneizó mecánicamente utilizando un POLYTRON™, triturado con mortero, o con un COMITROL™ en 1 volumen de Tris 50 mM frío a pH 8, NaCl 0,15 M. El tampón utilizado con el COMITROL™ contenía también metabisulfito de sodio al 0,04 %. Después de la homogeneización, la suspensión de material vegetal molido se centrifugó a 5.000 g durante 5 min a 4 °C y los extractos en bruto (sobrenadante) se mantuvieron para análisis. El contenido de proteína total de los extractos en bruto depurados se determinó por el ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albúmina sérica bovina como el patrón de referencia.

Extracción de VLP por digestión de la pared celular

Se recogió tejido foliar de las plantas de *Nicotiana benthamiana* y se cortó en trozos de ~1 cm². Los trozos de las hojas se remojaron en manitol 500 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La solución de manitol se eliminó luego y se cambió con la mezcla enzimática (mezcla de celulasas de *Trichoderma viride* (Onozuka R-10, 3 % v/v) y una mezcla de pectinasas de *Rhizopus* sp. (MACEROZYME™, 0,75 % v/v; ambos procedentes de Yakult Pharmaceuticals) en solución de protoplasto (manitol 500 mM, CaCl₂ 10 mM y MES/KOH 5 mM (pH 5,6)). La proporción utilizada fue de 20 g de trozos de hoja por 100 ml de solución. Esta preparación se extendió uniformemente en un recipiente poco profundo (~11 x 18 cm) y se incubó durante 16 horas en un agitador rotatorio a 40 rpm y 26 °C.

Como alternativa, la extracción de VLP se puede realizar como se indica a continuación: las plantas se agroinfiltraron con AGL1/# 685 como se describe en el ejemplo 1. Se recogió tejido foliar de las plantas de *N. benthamiana* en día 6 después de la infiltración y se cortaron en trozos de ~1 cm². Se añadieron Pectinasa FE Multifect CX CG y Multifect CX B (Genencor) a cada uno al 1,0 % (v / v) en un tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, bisulfito sódico al 0,04 % pH 6,0 usando una relación de 1:2,5 (p/v) de biomasa fresca; tampón de digestión. La biomasa se digirió durante 15 h a temperatura ambiente en un agitador orbital.

Después de la incubación, se eliminaron los residuos de hoja por filtración (filtro de nylon de malla de 250 o 400 µm). Los protoplastos en suspensión se recogieron por centrifugación a 200xg (15 min), seguido de centrifugación del sobrenadante a 5000xg (15 min) para clarificar adicionalmente el sobrenadante. Como alternativa, puede emplearse una sola etapa de centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos. Se centrifugaron a 70.000 xg durante 30 minutos 70 ml del sobrenadante. El sedimento resultante se suspendió de nuevo en 1,7 ml de PBS y se analizó inmediatamente o se congeló.

Análisis de proteínas

Un ensayo de hemaglutinación para H5 se basó en un método descrito por Nayak y Reichl (2004). En resumen, se hicieron diluciones en serie dobles de las muestras de ensayo (100 µl) en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron cien microlitros de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que mostró hemaglutinación completa se registró como actividad de hemaglutinación. En paralelo, se diluyó un estándar de HA5

recombinante (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) en PBS y funcionó como un control en cada placa.

ELISA

5

El estándar HA5 se preparó con partículas pseudovíricas purificadas que se alteraron por tratamiento con Triton X-100 al 1 % seguido de agitación mecánica en un Tissue Lyser™ (Qiagen) durante 1 min. Se recubrieron placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en U con 10 µg/ml de anticuerpo de captura (Immune Technology Corporation, # IT-003-0051) en tampón de revestimiento de carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,6) durante 16-18 horas a 4 °C. Todos los lavados se realizaron con PBS 0,01 M (solución salina tamponada con fosfato), pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,1 %. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces y se bloquearon con caseína al 1 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de la etapa de bloqueo, las placas se lavaron tres veces. El estándar HA5 se diluyó en un extracto mock (preparado a partir de tejido foliar infiltrado con AGL1/R472 en solitario) para generar una curva estándar de 500 a 50 ng/ml. Las muestras a cuantificar se trataron en Triton X-100 al 1 % antes de cargar la microplaca. Las placas se incubaron adicionalmente durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, se añadió anticuerpo policlonal de oveja contra HA5 (CBER/FDA) diluido 1:1000, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, se añadió anticuerpo anti-oveja de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:1000 y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Después de los lavados finales, las placas se incubaron con sustrato de peroxidasa TMB de SureBlue (KPL) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y los valores A₄₅₀ se midieron usando un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo Scientific).

Ejemplo 1: La extracción enzimática del tejido vegetal libera grandes cantidades de HA que tiene una actividad relativa elevada.

25

La cantidad y la actividad relativa de HA obtenida a partir del presente método de extracción enzimática se compararon con la de HA obtenida a partir de métodos de extracción mecánicos comunes. Las plantas de *N. benthamiana* se infiltraron con AGL1/685 y las hojas se cosecharon después de un período de incubación de cinco a seis días. Los homogeneizados de hojas se prepararon como se indica a continuación: Se homogeneizaron dos gramos de hojas con un homogeneizador Polytron; 4 g de hojas se molieron con un mortero; y 25 kg de hojas se homogeneizaron con un procesador COMITROL™ (Urschel Laboratories) en un tampón de extracción (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 8,0, relación 1:1 p/v). La extracción enzimática se realizó como se indica a continuación: Se sometieron veinte gramos de hojas recogidas a digestión con pectinasas de Macerozyme y celulasas Onozuka R-10 como se ha descrito anteriormente. Después de la digestión, se eliminaron los residuos de hojas por filtración (filtro de nylon, malla de 250 µm). Los protoplastos en suspensión se separaron por centrifugación a 200xg (15 min), y el sobrenadante se clarificó adicionalmente mediante centrifugación a 5000xg (15 min).

La actividad relativa y la cantidad de HA en cada uno de estos extractos de plantas se muestran en la Tabla 3. La cantidad de HA liberada por digestión enzimática de la pared celular es significativamente superior en comparación con las otras técnicas utilizadas.

40

Tabla 3: HA-VLP recuperadas forman el extracto vegetal generado por diferentes métodos mecánicos o enzimáticos. Para las comparaciones basadas en la actividad y ELISA, los datos se normalizaron de acuerdo con el volumen relativo de extracto líquido de biomasa fresca. La proteína obtenida usando la extracción de Comitrol se ajustó al 100 %, y los otros métodos se compararon con este valor.

45

Método de extracción	Actividad relativa	Cantidad*
Extracto de Comitrol™	100 %	100 %
Extracto de Polytron	50 %	150 %
Extracto de mortero	100 %	220 %
Extracto de digestión	440 %	570 %

*La cantidad se evaluó por análisis ELISA

Ejemplo 2: La digestión enzimática de los tejidos vegetales libera HA organizada en VLP.

Se utilizó una combinación de centrifugación diferencial y cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) para demostrar que la HA obtenida por el método de extracción enzimática descrito en el presente documento se organizó como VLP. Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con AGL1/685 como se describe en el Ejemplo 1. Se recogieron hojas de las plantas 6 días después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm², después se digirieron, se filtraron por grueso y se centrifugaron como se describe en el Ejemplo 1.

50

Las muestras clarificadas se centrifugaron entonces a 70.000 xg para permitir la segregación de las VLP. El sedimento de centrifugación, que contenía las VLP, se suspendió de nuevo cuidadosamente en 1/50 de volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato sódico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) antes de cargarse en una columna SEC.

Se prepararon columnas SEC de 32 ml de perlas SEPHACRYL™ S-500 de alta resolución (S-500 HR: GE Healthcare, Uppsala, Suecia, Cat. N.º 17-0613-10) con tampón de equilibrado/elución (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8). Se realizó cromatografía SEC con la carga de una muestra de 1,5 ml de VLP sobre la columna equilibrada, y su elución con 45 ml de tampón de equilibrado/elución. El eluato se recogió en fracciones de 1,7 ml y se evaluó el contenido de proteína de cada fracción mezclando 10 µl de la fracción de eluato con 200 µl de reactivo de colorante de proteína Bio-Rad diluido (Bio-Rad, Hercules, CA). Cada separación fue precedida por una calibración con Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, Estados Unidos). La comparación de los perfiles de elución tanto de Blue Dextran 2000 como de las proteínas huésped se realizó para cada separación para asegurar la uniformidad de las separaciones.

Análisis de proteínas de las fracciones eluidas SEC

El contenido de proteína total de los extractos en bruto depurados se determinó por el ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albúmina sérica bovina como el patrón de referencia. Las proteínas presentes en las fracciones de eluato SEC se precipitaron con acetona (Bollag et al., 1996), se suspendieron de nuevo en 0,25 en volumen o 0,05 en volumen de tampón de carga de muestra desnaturizante (Tris 0,1 M, pH 6,8, azul de bromofenol al 0,05 %, glicerol al 12,5 %, SDS al 4 %, y beta-mercaptoetanol al 5 %) para el análisis de SDS-PAGE o análisis de inmunotransferencia, respectivamente. La separación por SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras, y se utilizó Coomassie Brilliant Blue R-250 para la tinción de proteínas.

El ensayo de hemaglutinación para H5 se realizó basándose en un método descrito por Nayak y Reichl (2004). En resumen, se hicieron diluciones sucesivas dobles de las muestras de ensayo (100 µl) en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron cien microlitros de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que mostró hemaglutinación completa se registró como actividad de hemaglutinación. En paralelo, se diluyó un estándar de H5 recombinante (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) en PBS y funcionó como un control en cada placa.

La Figura 3A muestra que la actividad de hemaglutinación se concentra en las fracciones correspondientes al volumen vacío de la columna, confirmando que la actividad de hemaglutinación se origina a partir de una organización estructural de alto peso molecular. El análisis SDS-PAGE (Figura 3B) reveló que esas mismas fracciones de volumen vacío (fracciones 7-10) también presentan el contenido de HA más alto, siendo una banda correspondiente al monómero HA0 detectable a aproximadamente 75 kDa.

Ejemplo 3: La digestión enzimática del tejido vegetal libera HA-VLP con menos contaminantes

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con AGL1/685 como se describe en el Ejemplo 1. Se recogieron las hojas 6 días después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm², se digirieron, se filtraron por grueso y se centrifugaron como se describe en el Ejemplo 1.

La digestión enzimática controlada de las hojas eliminó las paredes celulares, al menos parcialmente, permitiendo así la liberación de proteínas y componentes presentes en el espacio entre la pared celular y la membrana plasmática en el medio de extracción. Dado que la mayoría de las proteínas y componentes intracelulares estaban aún sin dañar y contenidos dentro de los protoplastos en su mayoría intactos, una etapa de centrifugación inicial permitió su eliminación, proporcionando así una solución resultante que comprendía enzimas de degradación de la pared celular, además de las proteínas y componentes vegetales extracelulares (fracción apoplásica), como se muestra en la Figura 4.

La Figura 4 muestra un análisis SDS-PAGE de la solución resultante obtenida después de la digestión enzimática controlada de tejido foliar como se ha descrito previamente, mostrando el carril 1 la mezcla enzimática utilizada y mostrando el carril 2 la solución resultante después de la digestión enzimática. El contenido proteico de un extracto en bruto de Comitrol™ se proporciona en el carril 3 para comparación. La relación biomasa:tampón para el extracto

presentado en el carril 2 era 1:5 (p/v) mientras que fue 1:1 (p/v) para el del carril 3. Por lo tanto, cada uno de los carriles 2 y 3 contiene proteínas derivadas de una cantidad equivalente de material de partida. Para aproximadamente la misma relación de tampón:planta, un extracto de planta mecánico contenía una concentración de proteína de aproximadamente 3,5-4 mg/ml, mientras que el extracto de planta enzimático obtenido de acuerdo con el presente método presentaba una concentración de proteína de aproximadamente 1 mg/ml.

Se encontró que el principal contaminante presente en el carril 3 era RubisCo (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa), que está hecha de dos tipos de subunidades proteicas: una cadena grande (L, aproximadamente 55 kDa) y una cadena pequeña (S, aproximadamente 13 kDa). Un total de ocho dímeros de cadena grande y ocho de cadenas pequeñas suelen ensamblarse entre sí en un complejo más grande de RubisCo de 540 kDa. Aunque este contaminante proteico vegetal se encuentra en gran cantidad en extractos de plantas originados por el método de extracción mecánica (véase la flecha en la Figura 4), está virtualmente ausente en extractos de plantas obtenidos por el método de digestión enzimática descrito en el presente documento. Por lo tanto, el presente método permite la eliminación de este contaminante de proteína vegetal principal, entre otros, en una etapa temprana del proceso.

Ejemplo 4: La digestión enzimática del tejido foliar libera HA-VLP en condiciones en las que puede capturarse directamente en una resina de intercambio catiónico.

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con AGL1/685 como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 6 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm² y se digirieron durante 15 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. El tampón de digestión contenía pectinasa FE Multifect al 1,0 % (v/v), Multifect CX CG al 1,0 % (v/v), Multifect CX B al 1,0 % (v/v) (todos de Genencor), cada uno en una solución de Manitol 600 mM, Citrato 75 mM, tampón bisulfito sódico al 0,04 % pH 6,0 usando una relación de biomasa:tampón de digestión de 1:2,5 (p/v).

Después de la digestión, la fracción apoplásica se filtró a través de un filtro de nylon de 400 µm para retirar el tejido vegetal bruto grueso (<5 % de la biomasa de partida). El extracto filtrado se centrifugó entonces a temperatura ambiente durante 15 min a 5000xg para eliminar los protoplastos y los contaminantes intracelulares (proteínas, ADN, membranas, vesículas, pigmentos, etc.). A continuación, el sobrenadante se filtró en profundidad (para clarificación) usando un filtro de fibra de vidrio de 0,65 µm (Sartopore2/Sartorius Stedim) y un filtro de 0,45/0,2 µm, antes de someterse a cromatografía.

La fracción apoplásica clarificada se cargó sobre una columna de intercambio catiónico (Poros HS Applied Biosystems) equilibrada con un tampón de equilibrado/elución (NaPO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween 80 al 0,005 % pH 6,0). Una vez que el UV volvió a cero, el extracto se eluyó por etapas con el tampón de equilibrado/elución que contenía concentraciones crecientes de NaCl (500 mM). Cuando fue necesario, las fracciones cromatográficas se concentraron 10 veces utilizando dispositivos Amicon™ equipados con MWCO de 10 kDa. El análisis de proteínas se realizó como se describe en los ejemplos anteriores.

Bajo las condiciones anteriormente mencionadas, la mayoría de las enzimas y proteínas vegetales no se unen a la resina de intercambio catiónico, mientras que la HA-VLP se unió, proporcionando así un considerable enriquecimiento en HA-VLP en la fracción eluida (Figura 6). Además, como se muestra en la Figura 6, carril 4 y 5, las celulasas y pectinasas no se unieron a la columna de intercambio catiónico a un pH inferior a 7. Por consiguiente, la recuperación de la HA-VLP, basada en la actividad de hemaglutinación de HA, fue del 92 % antes de la carga sobre la columna de intercambio catiónico, y del 66 % en la fracción eluida. Se midió un factor de purificación de 194 en la fracción eluida de la resina de intercambio catiónico.

Ejemplo 5: Adición de NaCl al tampón de digestión

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (H1/Cal WT, B/Flo, H5/Indo o H1/Cal X179A) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 6 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm² y se digirieron de acuerdo con el Ejemplo 4, excepto cuando se indica a continuación. La filtración, centrifugación y clarificación se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

Se añadió NaCl al tampón de digestión para evaluar su efecto potencial sobre la tasa de recuperación de HA-VLP. Las ventajas sospechosas eran la prevención potencial de una asociación no específica de HA con células vegetales o con partículas en suspensión que se eliminan durante la clarificación y el efecto potencial sobre el logro y/o mantenimiento y/o mejora de la estabilidad coloidal de la HA-VLP.

La adición de NaCl 500 mM al tampón de digestión dio como resultado un aumento del rendimiento de recuperación de HA-VLP por gramo de biomasa después de la eliminación de protoplastos y de desechos celulares por centrifugación. Sin embargo, este aumento sólo se observó con el de las cepas H1/Cal WT y B/Flo, mientras que el 5 rendimiento de recuperación de H5 no se aumentó significativamente con este enfoque (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto de la adición de NaCl a la etapa de digestión sobre el rendimiento de recuperación de HA-VLP (según se midió por unidad de actividad de hemaglutinación, dil: recíproco de dilución)

Cepa de HA	Condiciones de digestión	Concentración en HA (dil/ml)	Rendimientos (dil/g)	Rendimiento aumentado (X veces) ¹
H5 Indo/05 (#972)	Ø NaCl	4608	12.430	1,2
	NaCl 500 mM	4608	14.921	
H1 CA/07 WT (#604)	Ø NaCl	384	1.206	2,1
	NaCl 500 mM	768	2.481	
H1 CA/07 X-179A (#605)	Ø NaCl	96	299	8,1
	NaCl 500 mM	768	2.419	
B Flo/4 (475)	Ø NaCl	16	52	7,5
	NaCl 500 mM	128	392	

¹ Rendimiento (dil/g) con NaCl dividido por el Rendimiento (dil/g) sin NaCl

10 La adición de NaCl 500 mM durante la digestión dio como resultado además un aumento de la liberación de HA-VLP durante la digestión, lo que a su vez dio como resultado una mayor tasa de recuperación después de la clarificación tanto para las cepas H1/Cal WT como H1/Cal X-179A (Tabla 5), pero no para la cepa H5/Indo.

Tabla 5: Efecto de la adición de NaCl a la etapa de digestión sobre el rendimiento de recuperación de HA-VLP (según se midió por unidad de actividad de hemaglutinación) después de la clarificación.

Cepa de HA	Condiciones de digestión	Recuperación después de la filtración profunda ¹	Aumento de la recuperación (X veces)
H5/Indo (#972)	Ø NaCl	100 %	1,0
	NaCl 500 mM	100 %	
H1/Cal WT (#604)	Ø NaCl	25 %	3,0
	NaCl 500 mM	75 %	
H1/Cal X-179A (#605)	Ø NaCl	50 %	2,0
	NaCl 500 mM	100 %	

¹La recuperación se expresa en porcentaje de actividad de hemaglutinación obtenida después de la filtración en profundidad en comparación con la actividad encontrada en el extracto digerido centrifugado.

Se estudió el estado de asociación de la HA-VLP, con y sin adición de NaCl durante la digestión enzimática, utilizando Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA) para H5/Indo y H1/Cal WT (Figura 7A y 7B, respectivamente). Se observó una preparación monodispersa de partículas para H5 cuando se realizó la digestión en ausencia de NaCl, mientras que la preparación de H1/Cal mostró una matriz mucho mayor de especies de partículas. La adición de NaCl al tampón de digestión redujo la auto-asociación HA-VLP para H1/Cal, como se muestra por la distribución de partículas bastante monodispersa encontrada en la Figura 7C. El número de partículas a 150 nm para WT-VLP de H1/Cal se potenció (aproximadamente 5 veces) mediante la adición de NaCl 500 mM al tampón de digestión.

Ejemplo 6: Control de la liberación de pigmentos

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (H5/Indo) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 6 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm², y se digirieron como se ha descrito en el Ejemplo 4, con la adición de NaCl 500 mM o NaCl 500 mM y EDTA 25 mM al tampón de digestión. La filtración, centrifugación y clarificación se realizaron como se describe en el Ejemplo 4.

La liberación de componentes que tienen un color verde durante la etapa de digestión enzimática condujo a una preparación purificada de VLP que tiene una coloración verdosa. Por lo tanto, la composición de la solución de digestión de la pared celular se investigó y se ajustó para obtener una preparación purificada de VLP que tenía una coloración verde reducida y, por lo tanto, una pureza aumentada. Sin pretender queda ligado a la teoría, puesto que

Ca²⁺ desempeña un papel crítico en la retención de constituyentes de las laminillas intermedias de la pared celular conjuntamente, y dado el hecho de que normalmente hay una alta concentración de Ca²⁺ en la pared celular de la planta, la adición de EDTA de Ca²⁺-quelante podría facilitar la despolimerización enzimática de la pared celular, preservando así organelos intracelulares intactos, tales como cloroplastos, e impidiendo los componentes de pigmentos verdes de liberación.

Como se muestra en la Tabla 6, la adición de EDTA 25 mM al tampón de digestión permitió la reducción de la coloración verde de la preparación de H5-VLP purificada, evaluada midiendo la diferencia en la absorción de la preparación (OD_{672 nm} - OD_{650 nm}). Cuando los constituyentes verdes se liberaron en gran cantidad, o no se eliminaron adecuadamente, la preparación de VLP mostró una $\Delta OD > 0,040$.

Tabla 6: Efecto de la adición de EDTA 25 mM al tampón de digestión sobre la coloración verde de las preparaciones de H5-VLP.

	OD _{672nm} - OD _{650nm}
NaCl 0 mM, EDTA 0 mM	0,071 ± 0,061
NaCl 500 mM	0,087 ± 0,060
NaCl 500 mM + EDTA 25 mM	0,010 ± 0,002

15 Ejemplo 7: Composiciones de tampón de digestión alternativas

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (H5/Indo) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 6 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm² y se digirieron de acuerdo con el Ejemplo 4, con la modificación del tampón de digestión para incluir Pectinasa Multifect FE, celulasa Multifect CX- CG y celulasa Multifect CX B al 0 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % o 1 % v/v como se indica en las Tablas 7-9. La filtración, centrifugación y clarificación fueron como se describe en el Ejemplo 4.

Como se muestra en las siguientes tablas 7 y 8, se ha demostrado que la pectinasa no es esencial en el tampón de digestión. Niveles similares de H5/Indo o H1/Cal WT VLP pueden extraerse con el presente método en presencia o ausencia de pectinasa. Además, se ha encontrado que la reducción de la concentración de celulasa en comparación con ejemplos anteriores no tuvo un impacto significativo en la calidad de la extracción (Tabla 9).

Tabla 7: Liberación de VLP H5/Indo por digestión de hojas de *N. benthamiana*. Todas las condiciones se ensayaron repetidas veces. (Concentración en HA-VLP medida por actividad de hemaglutinación, dil: recíproco de dilución)

Pectinasa (% v/v)	Celulasa* (% v/v)	Concentración en H5 VLP (dil/ml)
1	1	1152
0,5	1	6144
0	1	768
0	2	1536

*Multifect CX GC

Tabla 8: Liberación de H1/Cal WT VLP por digestión de hojas de *N. benthamiana*. Todas las condiciones se ensayaron repetidas veces. (Concentración en HA-VLP medida por actividad de hemaglutinación, dil: recíproco de dilución)

Pectinasa (% v/v)	Celulasa* (% v/v)	Concentración en H1 VLP (dil/ml)
1	2	2304
0	2	3840

*1 % de cada uno de Multifect CX GC y Multifect CX B

Tabla 9: Liberación de H1/Cal WT VLP por digestión de hojas de *N. benthamiana*. Todas las condiciones se ensayaron repetidas veces. (Concentración en HA-VLP medida por actividad de hemaglutinación, dil: recíproco de dilución)

Pectinasa (% v/v)	Celulasa* (% v/v)	Concentración en H1 VLP (dil/ml)
1,0	1	384
0,75	1	480
0,50	1	480
0,25	1	480

*Multifect CX GC

Ejemplo 8: Digestión enzimática en condiciones próximas al pH neutro

- El control del pH durante la digestión puede ser crítico para la extracción de algunas VLP. Teniendo en cuenta que la despolimerización de la pared celular que se produce durante la etapa de digestión puede liberar azúcares de ácido que podrían acidificar la solución (es decir, de pH 6 a 5) en presencia de tampones apropiados, y que algunas VLP (tales como las que comprenden H3/Bris y B/Flo HA) ya han demostrado una fuerte sensibilidad a condiciones ligeramente ácidas, se investigó el impacto de tal acidificación potencial en el rendimiento de la VLP producida.
- Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (B/Flo, H5/Indo, H3/Bris) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 6 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm² y se digirieron de acuerdo con el Ejemplo 4, con modificación de las condiciones de digestión para incluir NaCl 500 mM; EDTA 25 o 50 mM; bisulfito sódico al 0,03 o 0,04 %; manitol 0, 100, 200 o 600 mM, citrato 75, 125 o 150 mM; y/o NaPO₄ 75 mM; con el pH del tampón de digestión ajustado como se indica en las Tablas 10-14. La filtración, centrifugación y clarificación fueron como se describe en el Ejemplo 4.

Se ensayaron diversas composiciones de tampón de digestión para conseguir un pH de aproximadamente 5,5 al final de la digestión enzimática, incluyendo una concentración aumentada de citrato (efecto de tampón entre pH 3,0 y 5,4) y adición de fosfato de sodio (efecto de amortiguación a pH por encima de 6,0). La Tabla 10 muestra que las VLP de la cepa B se extrajeron más eficientemente cuando el pH posterior a la digestión estuvo cerca de pH 6,0.

Tabla 10: Efecto de la composición de tampón de digestión sobre el rendimiento de extracción de VLP B/Flo.

Composición de tampón ¹	Concentración de B/Flo VLP (dil/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	pH posterior a la digestión
Citrato 75 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM pH 6,0	1	0,92	5,0
Citrato 75 mM pH 6,0	0	1,43	5,6
Citrato 125 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM pH 6,0	1,5	1,07	5,4
Citrato 150 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM pH 6,0	1,5	1,07	5,4
Citrato 125 mM + NaPO ₄ 75 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM pH 6,5	4	2,19	5,9

¹Todos los tampones contenían manitol 600 mM, metabisulfito sódico al 0,04 %

- A continuación, se ensayó el efecto de iniciar la digestión a un pH mayor para alcanzar un valor de pH final cercano a pH 6,0. Como se muestra en la Tabla 11, fue posible la digestión de la pared celular vegetal con tales condiciones casi neutras, y no alteró el rendimiento de extracción para las VLP H5/Indo.

Tabla 11: Efecto del pH inicial del tampón de digestión sobre el rendimiento de extracción de las VLP H5/Indo.

pH inicial de la solución de digestión ¹	Concentración de VLP H5/Indo (dil/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	pH posterior a la digestión
6,5	2304	2,79	6,08
6,4	1536	2,31	5,93
6,3	2304	2,40	5,81
6,2	2304	2,09	5,73
6,1	2304	1,72	5,61

¹Todos los tampones de digestión contenían manitol 600 mM, metabisulfito sódico al 0,04 %, citrato 125 mM + NaPO₄ 75 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM

- También se demostró que otros componentes de la solución de digestión podían modificarse sin afectar negativamente al rendimiento de extracción de las VLP. La Tabla 12 ilustra modificaciones que se pueden aplicar a la solución de digestión con el fin de aumentar el rendimiento de extracción de VLP B/Flo, mientras se obtiene un pH post-digestión de 5,4-5,7. Dichas modificaciones incluyen el aumento de la concentración de citrato y la adición de un tampón PO₄. Se ha encontrado que el aumento de la concentración de EDTA condujo generalmente a un extracto más ácido y a reducir los rendimientos de extracción de VLP.

Tabla 12: Efecto de diversos componentes de tampón de digestión sobre el rendimiento de extracción de VLP B/Flo.

Composición de tampón ¹					Concentración de VLP B (dil/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	pH posterior a la digestión
Manitol (mM)	Citrato (mM)	PO ₄ (mM)	EDTA (mM)	pH			
600	75	0	25	6,1	2	1,07	5,0
600	125	0	25	6,1	192	0,83	5,7
600	125	75	25	6,2	192	1,81	5,5
600	125	75	50	6,2	96	1,26	5,4
200	125	75	25	6,2	384	1,05	5,7
200	125	75	50	6,2	96	1,04	5,4
200	125	75	75	6,2	96	1,55	5,4

¹Todos los tampones contenían NaCl 500 mM y metabisulfito sódico al 0,04 %.

La composición de tampón se modificó adicionalmente para mejorar el rendimiento de extracción de las VLP H3/Brisbane (Tabla 13)

5

Tabla 13: Efecto de las concentraciones de manitol y bisulfito sódico en la solución de digestión sobre el rendimiento de extracción de las VLP H3/Bris.

Composición de tampón				Concentración de proteínas (mg/ml)	pH posterior a la digestión
Manitol (mM)	Bisulfito sódico (%)	EDTA (mM)	pH		
600	0,04	25	6,2	1,87	5,7
600	0,04	50	6,2	1,62	5,6
200	0,03	25	6,2	1,89	5,7
200	0,03	50	6,2	1,24	5,6

¹Todos los tampones contenían Citrato 125 mM, NaPO₄ 75 mM, NaCl 500 mM.

Como se muestra en las Tablas 12 y 13, la concentración de manitol podría reducirse a 200 mM sin afectar significativamente al rendimiento de extracción de VLP. Una reducción adicional de las concentraciones de manitol a 100 mM, e incluso la omisión total de manitol de la solución de digestión, no afectó significativamente el nivel de HA-VLP obtenido (Tabla 14).

10

Tabla 14: Liberación de VLP H5/Indo de la digestión de la biomasa realizada en tampones con diferentes concentraciones de manitol.

15

Concentración de manitol de la solución de digestión ¹	Concentración de VLP H5/Indo (dil/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)
Estudio ² 1: sin manitol	2304	1,62
Estudio ² 1: con manitol 600 mM	3072	1,73
Estudio ² 2: con manitol 100 mM	4608	1,77
Estudio ² 2: con manitol 600 mM	4608	2,0

¹Todos los tampones contenían Citrato 75 mM pH 6,0 + metabisulfito sódico al 0,04 %.

²Se realizaron dos estudios para comparar los rendimientos de extracción de las VLP sin manitol (Estudio 1) y con manitol 100 mM (Estudio 2) frente a manitol 600 mM.

Ejemplo 9: Adecuación de la digestión enzimática a una amplia diversidad de HA-VLP

El método de digestión enzimática para biomasa vegetal descrito en el presente documento tiene el potencial de ser aplicado a la extracción de una amplia diversidad de HA-VLP. Además de la extracción de HA-VLP que comprendían H5/Indo, H1/Cal WT VLP, H3/Bris y B/Flo mostrada en ejemplos anteriores, también se demostró que el método descrito en el presente documento es adecuado para la extracción de HA-VLP de H1/Bris y H1/NC estacional, como se muestra en la Tabla 15.

20

Tabla 15: Liberación de VLP de H1/Bris y H1/NC estacional a partir de la digestión de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. (concentración en HA medida por la actividad de hemaglutinación, dil : recíproco de dilución)

Cepa de HA	Concentración en HA (dil/ml)
H1/Bri	1536
H1/NC	384

25

Ejemplo 10: Preparación, expresión y análisis de anticuerpos**Ensamblaje del casete de expresión C2B8 (construcción n.º 595)**

- 5 C2B8 es un anticuerpo monoclonal quimérico (de ratón/humano) dirigido contra el antígeno CD20 específico de linfocitos B expresado en linfomas no Hodgkin (NHL). C2B8 media la citotoxicidad del complemento y mediada por células dependientes de anticuerpo y tiene efectos antiproliferativos directos contra líneas de linfocitos B neoplásicas *in vitro* (N Selenko et. al., Leukemia, Octubre de 2001, 15 (10); 1619-1626).
- 10 Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende 84 pb del promotor de plastocianina de alfalfa, la secuencia codificante de cadena ligera de C2B8 completa y el terminador de plastocianina de alfalfa completo (fragmento LC). El fragmento LC estaba flanqueado por un sitio de restricción DralIII (que se encuentra en el promotor de plastocianina) y un sitio EcoRI aguas abajo del terminador de plastocianina. La secuencia del fragmento LC se presenta en la Figura 9 (SEQ ID NO:15). El plásmido que contenía el fragmento LC se digirió con DralIII y EcoRI y se
- 15 clonó en la construcción n.º 660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940), previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó construcción número 590. Se sintetizó un segundo fragmento de ADN que comprende 84 pb del promotor de plastocianina de alfalfa, la secuencia codificante de cadena pesada de C2B8 completa y el terminador de plastocianina de alfalfa completo (fragmento HC). El fragmento HC estaba
- 20 flanqueado por un sitio de restricción DralIII (que se encuentra en el promotor de plastocianina) y un sitio EcoRI aguas abajo del terminador de plastocianina. La secuencia del fragmento HC se presenta en la Figura 16 (SEQ ID NO:16). El plásmido que contenía el fragmento HC se digirió con DralIII y EcoRI y se clonó en la construcción n.º 660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940), previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó construcción número 592. La cepa de *A. tumefaciens* que comprende 592, se denomina "AGL1/592".
- 25 El plásmido que comprende un casete de expresión doble para la expresión de C2B8 (construcción n.º 595) se ensambló como se indica a continuación. El número de construcción 592 se digirió con EcoRI, se trató con un fragmento de Klenow para generar extremos romos y se digirió con SbfI. Los fragmentos resultantes, que comprenden el casete completo para la expresión de la cadena pesada de C2B8 flanqueada por un sitio SbfI y un
- 30 extremo romo, se insertaron en la construcción n.º 590 previamente digerida con SbfI y SmaI. La Figura 11A presenta una representación esquemática de la construcción n.º 595 utilizada para la expresión de C2B8 en plantas.

Ensamblaje del casete de expresión P19 (construcción n.º R472)

- 35 La construcción R472, que codifica la proteína p19 se ha descrito anteriormente ("Supresores de silenciamiento"; véase la Figura 11B)

Preparación de biomasa vegetal, inóculo bacteriano, agroinfiltración y cosecha

- 40 Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron como se ha descrito anteriormente ("Preparación de biomasa vegetal, inóculo, agroinfiltración y cosecha") en un invernadero bajo un fotoperiodo de 16/8 y un régimen de temperatura de 25 °C día/20 °C noche. Tres semanas después de la siembra, las plántulas individuales se seleccionaron, se transplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales bajo las mismas condiciones ambientales.
- 45 Se cultivaron construcciones que portaban agrobacterias n.º 595 o R472 en medio de caldo BBL Select APS complementado con ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES) 10 mM, 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de carbenicilina pH 5,6 hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ > 2,0. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se
- 50 almacenaron durante una noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en volúmenes de 6,7 cultivos y se dejaron calentar antes del uso. Las plantas completas de *N. benthamiana* se colocaron al revés en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 1 min. Tras la infiltración, las plantas se devolvieron al invernadero durante un periodo de incubación de 5 días hasta la cosecha. Las infiltraciones se realizaron como coinfiltración con las cepas AGL1/595 y AGL1/R472 en una relación 1:1.
- 55

Muestreo de hojas y extracción total de proteínas (extracción mecánica)

Después de la incubación, se recolectó la parte aérea de las plantas y se usó inmediatamente. Las proteínas solubles totales se extrajeron homogeneizando el tejido vegetal en un mezclador doméstico durante 3 min con 1,5

volúmenes de NaPO₄ 20 mM frío, pH 6,0, NaCl 0,15 M y metabisulfito sódico 2 mM. Después de la homogeneización, la suspensión de material vegetal molido se filtró en Miracloth para eliminar grandes restos insolubles. El pH del extracto se ajustó a 4,8 por adición de HCl 1 M y los materiales no solubles se eliminaron por centrifugación a 18 000 g durante 15 minutos (4 °C). El sobrenadante se recogió y el pH se ajustó a 8,0 con Tris base 2 M. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación a 18 000 g durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el extracto en bruto (sobrenadante). El contenido de proteína total de los extractos en bruto depurados se determinó por el ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albúmina sérica bovina como el patrón de referencia.

10 **Extracción de proteínas por digestión de la pared celular**

Se recogió tejido foliar de las plantas de *Nicotiana benthamiana* y se cortó en trozos de ~1 cm². Los trozos de hoja se colocaron en 2,425 volúmenes de solución de digestión (citrate 75 mM, pH 6,9, manitol 600 mM, Pectinase Multifect al 1 % FE, Multifect CXG al 1 %, Multifect B al 1 %). Esta preparación se extendió uniformemente en un recipiente poco profundo y se incubó durante 16 horas en un agitador orbital a 120 rpm y a 18 °C. Después de la incubación, los restos de hojas se eliminaron por filtración en un filtro de nylon (malla de 250 µm). El extracto se centrifugó a 5 000 g durante 15 min (22 °C) y el sobrenadante se recogió y se filtró en 0,65 µm de fibra de vidrio. El extracto se ajustó a pH 6,0 con una base de Tris 0,5 M y se filtró en una membrana de PES de 0,45/0,22 µm.

20 **Precipitación de sulfato de amonio y purificación de anticuerpos**

Se añadió lentamente sulfato de amonio a extractos de proteína para alcanzar el 45 % de saturación. El extracto se mantuvo en hielo durante 60 min y se centrifugó a 18 000 g durante 20 min (4 °C). El sobrenadante se descartó y el sedimento se mantuvo congelado (-80 °C) hasta su uso.

El sedimento de proteína congelada se descongeló y se resuspendió en 1/10 de volumen (en comparación con el volumen antes de la precipitación) de la solución de resuspensión de proteínas (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM). La solución de proteína se centrifugó a 12 000 g durante 20 min (4 °C) para eliminar los materiales no solubilizados. La solución de proteína se cargó sobre resina MabSelect Sure (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canadá). La columna se lavó con 10 VC de Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y el anticuerpo se eluyó con 6 VC de citrato sódico 100 mM, pH 3,0. El volumen de elución se recogió en fracciones de 1 VC en tubos que contenían 1/10 VC de Tris 2 M, pH 7,4, NaCl 150 mM. Las fracciones de elución se seleccionaron basándose en su contenido de proteínas (medido por Bradford) y las fracciones seleccionadas se combinaron y se mantuvieron congeladas (-80 °C) antes del análisis.

35 **Cuantificación de proteínas y análisis de SDS-PAGE**

El contenido de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albúmina sérica bovina (para extractos de proteína en bruto) o rituximab comercial (Rituxan®, Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canadá) (para anticuerpos purificados) como estándar de referencia. La SDS-PAGE teñida con Coomassie se realizó como se describe por Laemmli (Nature 1970, 227: 680-685).

Cuantificación de C2B8 por ELISA

Se recubrieron placas de múltiples pocillos (Immulon 2HB, ThermoLab System, Franklin, MA) con 2,0 µg/ml de IgG antihumana de ratón monoclonal (Abcam, Ab9243) en tampón de carbonato 50 mM (pH 9,6) a 4 °C durante 16-18 h. Después, las placas de múltiples pocillos se bloquearon a través de una incubación de 1 h en caseína al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) a 37 °C. Se generó una curva estándar con diluciones de Rituximab (Rituxan®, Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canadá). Al realizar los inmunoensayos, todas las diluciones (control y muestras) se realizaron en un extracto de planta obtenido de tejido vegetal infiltrado e incubado con un inóculo mock (solamente AGL1/R472) para eliminar el efecto de la matriz. Las placas se incubaron con muestras de proteínas y diluciones de curva estándar durante 1 h a 37 °C. Después de tres lavados con Tween-20 al 0,1 % en PBS (PBS-T), las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG humano de burro conjugado con peroxidasa (dilución 1/4000 en solución de bloqueo) (Jackson ImmunoResearch 709-035-149) durante 1 h a 37 °C. Se repitieron los lavados con PBS-T y las placas se incubaron con un sustrato de peroxidasa Sure Blue de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (KPL, Gaithersburg, MD). La reacción se detuvo mediante la adición de HCl 1 N y la absorbancia se leyó a 450 nm. Cada muestra se ensayó por triplicado y las concentraciones se interpolaron en la porción lineal de la curva estándar.

Análisis de N-glicano

Las muestras que comprendían C2B8 (Rituxan™; 50 µg) se separaron en SDS/PAGE al 15 %. Las cadenas pesadas y ligeras se revelaron con azul de Coomassie y la banda de proteína correspondiente a la cadena pesada se escindió y se cortó en pequeños fragmentos. Los fragmentos se lavaron 3 veces con 600 µl de una solución de 5 NH₄HCO₃ 0,1 M/CH₃CN (1/1) durante 15 minutos cada vez y se secaron.

La reducción de los puentes disulfuro se produjo mediante la incubación de los fragmentos de gel en 600 µl de una solución de DTT 0,1 M en NH₄HCO₃ 0,1 M, a 56 °C durante 45 minutos. La alquilación se realizó añadiendo 600 µl de una solución de yodoacetamida 55 mM en NH₄HCO₃ 0,1 M, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los 10 sobrenadantes se descartaron y los fragmentos de poliacrilamida se lavaron una vez más en NH₄HCO₃ 0,1 M/CH₃CN (1/1).

Las proteínas se digirieron luego con 7,5 µg de tripsina (Promega) en 600 µl de NH₄HCO₃ 0,05 M, a 37 °C durante 16 h. Se añadieron doscientos µl de CH₃CN y se recogió el sobrenadante. Los fragmentos de gel se lavaron 15 entonces con 200 µl de NH₄HCO₃ 0,1 M, luego con 200 µl de CH₃CN de nuevo y finalmente con 200 µl de ácido fórmico al 5 %. Todos los sobrenadantes se agruparon y se liofilizaron.

Los glucopéptidos se separaron de los péptidos mediante cromatografía en un cartucho Sep-Pack C18. Los glucopéptidos se eluyeron específicamente con CH₃CN al 10 % en agua y luego se analizaron mediante MALDI- 20 TOF-MS en un instrumento Voyager DE-Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, Estados Unidos) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Los espectros de masas se realizaron en el modo de extracción retardado del reflector utilizando ácido dihidrobenzoico (Sigma-Aldrich) como matriz.

Ejemplo 11: Comparación de los rendimientos de extracción de anticuerpo C2B8

25 Se comparó la digestión enzimática con la extracción mecánica para la extracción de anticuerpo C2B8. Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con AGL1/595 y AGL1/R472. Después de 6 días de incubación, las hojas se cosecharon y las proteínas se extrajeron por digestión enzimática o extracción mecánica. Las extracciones se realizaron dos veces y los extractos resultantes se compararon para determinar el volumen, la concentración de 30 proteínas y el contenido de anticuerpos (C2B8). Los resultados se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16: Comparación del rendimiento de extracción por interrupción mecánica (extracción del mezclador) y digestión enzimática de las paredes celulares.

Lote de extracción	Biomasa tratada (g)	Volumen de extracto en bruto (ml)	Concentración de proteína en el extracto (mg/ml)	Concentración de C2B8 (% de TSP)	Rendimiento de extracción de C2B8 (mg C2B8/kg de FW)
Mezclador, lote n.º 1	700	1400	2,42	3,33 %	161,4
Mezclador, lote n.º 2	700	1480	2,47	3,65 %	190,5
Digestión, lote n.º 1	700	2337	1,45	4,89 %	236,6
Digestión, lote n.º 2	700	2233	1,64	4,68 %	244,9

35 A partir de 700 g de biomasa, la extracción mecánica generó un promedio de 1440 ml de extracto de proteína mientras que la digestión generó 2285 ml de extracto de proteína. El porcentaje de anticuerpo C2B8 fue mayor en el extracto de la digestión (valor promedio del 479 % de proteínas extraídas) que en el extracto producido en el mezclador (valor promedio del 3,49 % de proteína extraída). En conjunto, el mayor volumen de extracto y la mayor 40 concentración de anticuerpos encontrados en el extracto dan como resultado un rendimiento de extracción mayor al 37 % para la digestión (240,75 mg de C2B8/kg peso fresco) que la extracción mecánica (175,95 mg de C2B8/kg peso fresco).

Ejemplo 13: Comparación de anticuerpo C2B8 purificado (contenido de proteína)

45 El anticuerpo C2B8 se purificó a partir de los extractos mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A como se describe en el Ejemplo 10. Los productos purificados a partir de extractos obtenidos por extracción mecánica o digestión se compararon sobre la base de su contenido de proteína. El perfil electroforético de los anticuerpos purificados de cada lote de extracción se muestra en la Figura 12. Los resultados muestran que los perfiles de los

productos purificados de la extracción del mezclador o de la digestión de la pared celular son similares.

Ejemplo 14: Comparación de anticuerpo C2B8 purificado (N-glucosilación)

- 5 La N-glucosilación de proteínas consiste en la adición de una estructura de glicano complejo en la asparagina de proteínas secretadas que llevan la secuencia NXS/T, donde N es la asparagina, X es cualquier aminoácido excepto una prolina y S/T es una serina o una treonina. Se añade un glicano precursor temprano en el retículo endoplasmático durante la traducción de la proteína y, durante su tránsito a través de la ruta de secreción, los N-glicanos se someten a maduración. A partir de un N-glicano de tipo alto contenido en manosa en el retículo
- 10 endoplasmático (RE), la maduración de N-glicanos en plantas incluye la adición y eliminación de residuos de glucosa, la eliminación de manosas en posiciones distales y la adición de N-acetilglucosamina, xilosa, fucosa y residuos de galactosa. La maduración de N-glicanos en las plantas se describe por Gomord et al. en la modificación posttraduccional de proteínas terapéuticas en plantas (Curr. Opin. Plant Biol. 2004, 7: 171-181). Las enzimas de la ruta de N-glucosilación se colocan en lugares precisos en cada compartimento de la ruta de secreción,
- 15 concretamente el retículo endoplasmático, la región cis del aparato de Golgi, el aparato de Golgi medial y la región trans del aparato de Golgi. Por lo tanto, el patrón de N-glucosilación de una proteína diferirá dependiendo de su posición en el momento de la extracción. Se ha observado previamente que una cierta proporción de un anticuerpo producido usando la agroinfiltración de *N. benthamiana* portaba N-glicanos inmaduros de alto contenido de manosa a pesar de dirigirse al apoplasto (Vézina et al., Plant Biotechnol. J. 2009 7: 442-455). Se informó una observación
- 20 similar en otra parte (Sriraman et al., Plant Biotechnol. J. 2004, 2, 279-287). En ambos casos, la presencia de N-glicanos inmaduros en una cierta proporción de anticuerpos se interpretó como la consecuencia de la presencia de anticuerpos en compartimentos tempranos de la ruta de secreción en el momento de la extracción.

- El siguiente estudio examinó si la extracción de glucoproteínas secretadas por digestión de la pared celular
- 25 preferiblemente extraía proteínas recombinantes que portaban N-glicano complejo. Se espera que los anticuerpos y otras glucoproteínas secretadas en el apoplasto porten N-glicanos que han completado su maduración. Los N-glicanos maduros con mayor frecuencia portan residuos de N-acetilglucosamina o galactosa terminales y también se denominan N-glicanos complejos. Por el contrario, los N-glicanos inmaduros, que se encuentran principalmente en las proteínas *en route* en la ruta secretora, comprenden residuos de manosa terminales. El alto contenido de
- 30 manosa de los N-glicanos en C2B8 (Rituxan™) se ha asociado con una semivida reducida en el flujo sanguíneo (Kanda et al., Glycobiology 2006, 17: 104-118). En este contexto, sería deseable un método de extracción capaz de favorecer la extracción de glucoproteínas apoplásticas que llevan N-glicanos complejos de plantas.

- Se realizó un análisis comparativo de la N-glucosilación en anticuerpos C2B8 purificados como se describe en el
- 35 Ejemplo 10. Los resultados demuestran que los anticuerpos purificados a partir de biomasa digerida portaban una proporción significativamente menor de N-glicanos oligomannosídicos (Figura 13A) y, como un corolario, una proporción significativamente mayor de N-glicanos complejos (Figura 13B).

- La extracción por digestión de la pared celular también podría aplicarse a plantas que coexpresan una glucoproteína
- 40 y una o más enzimas para modificar el perfil de N-glucosilación como se describe en el documento WO 20008/151440 (*Modifying glycoprotein production in plants*) para favorecer la recuperación de glucoproteínas que portan N-glicanos maduros modificados. Por ejemplo, los N-glicanos maduros podrían reducirse, o quedar exentos de residuos de xilosa y fucosa.

- El método para modificar la N-glucosilación puede implicar la coexpresión de la proteína de interés junto con una secuencia de nucleótidos que codifica beta-1,4galactosiltransferasa (GalT; proporcionada como SEQ ID NO:14 del documento WO 20008/151440), por ejemplo, pero sin limitación, GalT de mamífero, o GalT humano, sin embargo, también se puede usar GalT de otras fuentes. El dominio catalítico de GalT (por ejemplo, los nucleótidos 370-1194 de SEQ ID NO:14 como se describe en el documento WO 20008/151440), también se puede fusionar a un dominio
- 50 CTS de N-acetilglucosaminil transferasa (GNT1; por ejemplo, que comprende los nucleótidos 34-87 de SEQ ID NO:17 como se proporciona en el documento WO 20008/151440), para producir una enzima híbrida GNT1-GalT. La enzima híbrida puede coexpresarse con una secuencia que codifica la proteína de supraestructura de interés. Adicionalmente, la secuencia que codifica la supraestructura de interés puede coexpresarse con una secuencia de nucleótidos que codifica N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III, SEQ ID NO: 16 como se describe en el
- 55 documento WO 20008/151440). También se puede usar GnT-III de mamífero o GnT-III de ser humano, GnT-III de otras fuentes. Adicionalmente, también se puede usar una enzima híbrida GNT1-GnT-III (SEQ ID NO:26; como se describe en el documento WO 20008/151440), que comprende el CTS de GNT1 fusionado a GnT-III.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Medicago Inc. VEZINA, Louis-Philippe DARGIS, Michele COUTURE, Manon PAQUET, Dany D'AOUST, Marc-Andre	
10	<120> MÉTODO PARA PREPARAR PROTEÍNAS DERIVADAS DE PLANTAS	
	<130> V82625WO	
15	<150> 61/244.786 <151> 22-09-2009	
	<160> 16	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1 <211> 3067 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Construcción sintetizada 685	
	<400> 1	
	ttaattaaga attcgagctc caccgcggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct	60
	gtcactttat tgagaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc catcattgcg	120
	ataaaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgcccagag tggccccaaa gatggacccc	180
	caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg	240
	attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcáag	300
	acccttctct tatataagga agttcatttc atttggagag gtattaaaaat cttaatagggt	360
	tttgataaaa gcgaacgtgg ggaaaccgga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc	420
	tctcttaaag caaacttctc tcttgtcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga	480
	tcgtgcttcg gcaccagtac aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg	540
	tggacacgta gtgcggcgcc attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt	600
	cttgggaaaa gaaagcttgc tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgtttacgat	660
	tctgctgact ttgcggcgggt gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgcttg	720
	tacttcttct ttcttcttct tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa	780
	acagagtttt cccgtggttt tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg	840
	cccaaatttg tcgggcccac ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt cagtcttggt	900
30	aaaagtgatc agatttgcac tggttaccat gcaacaatt caacagagca gggtgacaca	960

ES 2 662 778 T3

atcatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccagaca tactggaaaa gacacacaac	1020
gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt taagagattg tagtgtagct	1080
ggatggctcc tcgggaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtaccgga atggtcttac	1140
atagtggaga aggccaatcc aaccaatgac ctctgttacc caggagttt caacgactat	1200
gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca aatcatcccc	1260
aaaagttctt ggtccgatca tgaagcctca tcaggagtta gctcagcatg tccatacctg	1320
ggaagtccct ccttttttag aatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacataccca	1380
acaataaaga aaagctacaa taataccaac caagaggatc ttttgggtact gtggggaatt	1440
caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggtatatc aaaaccaac cacctatatt	1500
tccattggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aaatagctac tagatccaaa	1560
gtaaacgggc aaagtgaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc taatgatgca	1620
atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag	1680
aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa caccaagtgt	1740
caaactccaa tggggcgat aaactctagt atgccattcc acaacataca ccctctacc	1800
atcggggaat gcccacaaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac agggctcaga	1860
aatagccctc aaagagagag cagaagaaaa aagagaggac tatttgagc tatagcaggt	1920
tttatagagg gaggatggca gggaatggta gatggttgg atgggtacca ccatagcaat	1980
gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc	2040
accaataagg tcaactcaat cattgacaaa atgaacactc agtttgaggc cgttgggaag	2100
gaatttaata acttagaaaag gagaatagag aatttaacaa agaagatgga agacgggttt	2160
ctagatgtct ggacttataa tgccgaactt ctggttctca tggaaaatga gagaactcta	2220
gactttcatg actcaaatgt taagaacctc tacgacaagg tccgactaca gcttagggat	2280
aatgcaaagg agctgggtaa cggttgtttc gagttctatc acaaatgtga taatgaatgt	2340
atggaaagta taagaaacgg aacgtacaac tatccgcagt attcagaaga agcaagatta	2400
aaaagagagg aaataagtgg ggtaaaattg gaatcaatag gaacttacca aatactgtca	2460
atttattcaa cagtggcgag ttccctagca ctggcaatca tgatggctgg tctatcttta	2520
tggatgtgct ccaatggatc gttacaatgc agaatttgca tttaaaggcc tattttcttt	2580
agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgat ttctatgttt ggtgagcgg tttctgtgct	2640
cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tcttttgtag ctctgttta gcaggctgct	2700
ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat ttatttaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg	2760
gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa catttgcaa taaagttct	2820

ES 2 662 778 T3

taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 2880
 ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 2940
 ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 3000
 aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga ttctagagtc tcaagcttcg 3060
 gcgcgcc 3067

<210> 2
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Aminoácido sintetizado codificado por Seq Id No: 1

<400> 2
 Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15
 Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30
 Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45
 Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60
 Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 130 135 140
 Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg

ES 2 662 778 T3

210	215	220
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly		
225	230	235 240
Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn		
	245	250 255
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile		
	260	265 270
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly		
	275	280 285
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser		
	290	295 300
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys		
305	310	315 320
Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser		
	325	330 335
Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile		
	340	345 350
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr		
	355	360 365
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys		
	370	375 380
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser		
385	390	395 400
Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe		
	405	410 415
Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp		
	420	425 430
Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met		
	435	440 445
Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu		
	450	455 460
Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly		
465	470	475 480
Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu		
	485	490 495
Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala		
	500	505 510
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly		
	515	520 525
Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala		
	530	535 540

ES 2 662 778 T3

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

5 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado pBinPlus.2613c

15 <400> 3
aggaagggaa gaaagcgaaa ggag 24

20 <210> 4
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado Mut-ATG115.r

30 <400> 4
gtgccgaagc acgatctgac aacgttgaag atcgctcacg caagaaagac aagaga 56

35 <210> 5
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado Mut-ATG161.c

45 <400> 5
gtgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tactgaagc ga 52

50 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado LC-C5-1.110r

60 <400> 6
tctcctggag tcacagacag ggtgg 25

65 <210> 7
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado Apal-H5 (A-Indo) .1c

	<400> 7	
	tgtcgggcc atggagaaa tagtgcttct tcttgcaat	39
5	<210> 8	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintetizado H5 (A-Indo)-Stul.1707r	
	<400> 8	
	aaataggcct taaatgcaa attctgcatt gtaacga	37
15	<210> 9	
	<211> 3111	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Construcción de oligonucleótido sintetizado 660	
	<400> 9	

ES 2 662 778 T3

agaggtagcc cggtctggtat tttttatg ttgtcaaata actcaaaaac cataaaagtt	60
taagtttagca agtgtgtaca tttttacttg aacaaaaata ttcacctact actgttataa	120
atcattatta aacattagag taaagaaata tggatgataa gaacaagagt agtgatattt	180
tgacaacaat tttgttgcaa catttgagaa aattttgttg ttctctcttt tcattgggtca	240
aaaacaatag agagagaaaa aggaagaggg agaataaaaa cataatgtga gtatgagaga	300
gaaagttgta caaaagttgt accaaaatag ttgtacaaat atcattgagg aatttgacaa	360
aagctacaca aataagggtt aattgctgta aataaataag gatgacgcat tagagagatg	420
taccattaga gaatttttgg caagtcatta aaaagaaaga ataaattatt tttaaaatta	480
aaagttgagt catttgatta aacatgtgat tatttaataa attgatgaaa gagttggatt	540
aaagttgtat tagtaattag aatttggtgt caaatttaat ttgacatttg atcttttcct	600
atatattgcc ccatagagtc agttaactca tttttatatt tcatagatca aataagagaa	660
ataacggtat attaatccct ccaaaaaaaa aaaacggtat atttactaaa aaatctaagc	720
cacgtaggag gataacagga tcccgtagg aggataacat ccaatccaac caatcacaac	780
aatcctgatg agataaccca ctttaagccc acgcatctgt ggacacatcta cattatctaa	840
atcacacatt cttccacaca tctgagccac acaaaaacca atccacatct ttatcaccca	900
ttctataaaa aatcacactt tgtgagtcta cactttgatt cccttcaaac acatacaaag	960
agaagagact aattaattaa ttaatcatct tgagagaaaa tggagaaaat agtgcttctt	1020
cttgcaatag tcagtcttgt taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaaacaat	1080
tcaacagagc aggttgacac aatcatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac	1140
atactggaaa agacacacaa cgggaagctc tgcgatctag atggagtga gaccttaatt	1200

ES 2 662 778 T3

ttaaagagatt gtagtgtagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc	1260
aatgtaccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac	1320
ccaggggagtt tcaacgacta tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt	1380
gagaaaatc aaatcatccc caaaagttct tggtecgatc atgaagcctc atcaggagtt	1440
agtcagcat gtccatacct gggaagtccc tctttttta gaaatgtggt atggcttacc	1500
aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaggat	1560
cttttggtac tgtggggaat tcaccatcct aatgatgagg cagagcagac aaggctatat	1620
caaaacccaa ccacctatat ttccattggg acatcaacac taaaccagag attggtacca	1680
aaaatagcta ctagatccaa agtaaaggc caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca	1740
attttaaaac ctaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa	1800
tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat	1860
ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca atggggggcga taaactctag tatgccattc	1920
cacaacatac accctctcac catcggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta	1980
gtccttgcaa cagggtcag aaatagcctt caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga	2040
ctatttgagg ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttgg	2100
tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatecact	2160
caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact	2220
cagtttgagg ccgttggaag ggaatttaat aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac	2280
aagaagatgg aagacggggt tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctgggtctc	2340
atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag	2400
gtccgactac agcttaggga taatgcaaag gagctgggta acggttgttt cgagttctat	2460
cacaaatgtg ataatgaatg tatggaaagt ataagaaacg gaacgtacaa ctatccgag	2520
tattcagaag aagcaagatt aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata	2580
ggaacttacc aaatactgtc aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc	2640
atgatggctg gtctatcttt atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc	2700
atttaagagc tctaagttaa aatgcttctt cgtctcctat ttataatatg gtttgttatt	2760
gttaattttg ttcttgtaga agagcttaat taatcgttgt tgttatgaaa tactatttgt	2820
atgagatgaa ctggtgtaat gtaattcatt tacataagtg gagtcagaat cagaatgttt	2880
cctccataac taactagaca tgaagacctg ccgcgtacaa ttgtcttata tttgaacaac	2940
taaaattgaa catcttttgc cacaacttta taagtgggta atatagctca aatatatggt	3000
caagttcaat agattaataa tggaaatata agttatcgaa attcattaac aatcaactta	3060
acgttattaa ctactaattt tatatcatcc ctttgataa atgatatgac a	3111

<211> 26
<212> PRT
<213> Medicago sativa

5 <400> 10
Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Glu Glu
 20 25

<210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintetizado Plasto-443c

<400> 11
gtattagtaa ttagaatttg gtgtc 25

<210> 12
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintetizado supP19-plasto.r

<400> 12
cctgtatag ctcgttccat ttctctcaa gatg 34

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintetizado supP19-1c

<400> 13
atggaacgag ctatacaagg 20

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintetizado SupP19-Sacl.r

<400> 14
agtcgagctc ttactcgctt tcttttcga ag 32

<210> 15
<211> 1214
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento LC sintetizado de C2B8

5

<400> 15

```
cactttgtga gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta      60
attaattaat catcttgaga gaaaatggat tttcaggtgc agattatcag ctctctgcta      120
atcagtgcctt cagtcataat gtccagagga caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc      180
ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt      240
tacatccact gggtccagca gaagccagga tctccccc aaccctggat ttatgccaca      300
tccaacctgg ctctctggagt cctgttcgc ttcagtggca gtgggtctgg gacttcttac      360
tctctcacia tcagcagagt ggaggtgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg      420
actagtaacc caccacggt cggagggggg accaagctgg aaatcaaacg tacggtggct      480
gcaccatctg tcttcattct cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct      540
gttggtgtgc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat      600
aacgcctcc aatcggttaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc      660
acctacagcc tcagcagcac cctgacgtg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc      720
tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgccg tcacaaagag cttcaacagg      780
ggagagtgtt gagacgtcgt taaaatgctt cttcgtctcc tatttataat atggtttgtt      840
attgttaatt ttgttcttgt agaagagctt aattaatcgt tgttggtatg aaatactatt      900
tgtatgagat gaactgggtg aatgtaattc atttacataa gtggagtcag aatcagaatg      960
tttctccat aactaactag acatgaagac ctgccgcgta caattgtctt atatttgaac     1020
aactaaaatt gaacatcttt tgccacaact ttataagtgg ttaatatagc tcaaatatat     1080
ggtcaagtcc aatagattaa taatggaat atcagttatc gaaattcatt aacaatcaac     1140
ttaacgttat taactactaa ttttatatca tccccttga taaatgatag tacaccaatt     1200
aggaaggaga attc                                     1214
```

<210> 16

<211> 1919

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Fragmento HC sintetizado de C2B8

15

<400> 16

```
cactttgtga gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta      60
```

ES 2 662 778 T3

attaattaat catcttgaga gaaaatgggt tggagcctca tcttgctctt ccttgctgct	120
gttgctacgc gtgtcctgtc ccaggtacaa ctgcagcagc ctggggctga gctgggtgaag	180
cctggggcct cagtgaagat gtcttgcaag gcttctggct acacatttac cagttacaat	240
atgcactggg taaaacagac acctggctcg ggcttgaat ggattggagc tatttatccc	300
ggaaatgggt ataacttcta caatcagaag ttcaaaggca aggccacatt gactgcagac	360
aaatcctcca gcacagccta catgcagctc agcagcctga catctgagga ctctgcggtc	420
tattactgtg caagatcgac ttactacggc ggtgactggg acttcaatgt ctggggcgca	480
gggaccacgg tcaccgtctc tgcagctagc accaagggcc catcggtctt cccctggca	540
ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggg caaggactac	600
ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc	660
ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc	720
tccagcagct tgggcacca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	780
aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc	840
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac	900
accctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa	960
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1020
aagccgctgg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1080
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	1140
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ctagggaacc acaagtgtac	1200
actcttccac catctaggga tgagcttact aagaaccaag tttctcttac ttgtcttggtg	1260
aagggaatgt atccatctga catcgccgtg gaatgggaat ccaacggaca accagagaac	1320
aattacaaga ctactccacc agttcttgat tctgatggat ccttctttct ttattccaag	1380
cttactgttg ataagtccag atggcagcaa ggaaatgtgt tctcttggtc tgttatgcac	1440
gaagctcttc ataataatta tactcaaaag tcctttctc tttctcctgg aaagtgcagc	1500
gtcgttaaaa tgcttcttcg tctctatgt ataatatgg ttgttattgt taattttgtt	1560
cttgtagaag agcttaatta atcgttggtg ttatgaaata ctatttgtat gagatgaact	1620
ggtgtaatgt aattcattta cataagtggg gtcagaatca gaatgtttcc tccataacta	1680
actagacatg aagacctgcc gcgtacaatt gtcttatatt tgaacaacta aaattgaaca	1740
tcttttgcca caactttata agtgggtaat atagctcaaa tatatgggtc agttcaatag	1800
attaataatg gaaatatcag ttatcgaaat tcattaacaa tcaacttaac gttattaact	1860
actaatatta tatcatcccc ttgataaat gatagtagac caattaggaa ggagaattc	1919

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar proteínas derivadas de plantas, o una supraestructura de proteínas, que comprende:
 - a. obtener de una planta o materia vegetal que comprende proteínas localizadas en el apoplasto, o proteínas de supraestructura; en el que la materia vegetal consiste en plantas enteras, hojas de plantas, tallos, frutos, raíces o una combinación de los mismos;
 - b. producir una fracción de protoplastos/esferoplastos y una fracción de apoplasto por tratamiento de la planta o materia vegetal con una mezcla enzimática de múltiples componentes que degrada la pared celular que consiste en celulasa, o una mezcla enzimática de múltiples componentes que degrada la pared celular que comprende una o más de una celulasa y una pectinasa, en la que la relación de celulasa con respecto a pectinasa es de 1:1 a 1:0,25; y,
 - c. recuperar la fracción apoplásica, comprendiendo la fracción apoplásica las proteínas derivadas de plantas, o las proteínas de supraestructura, en donde las supraestructuras de proteínas tienen un peso molecular de 75 a 1500 kDa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la relación de celulasa con respecto a pectinasa es de 1:1, 1:0,75, 1:0,5 o 1:0,25.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla enzimática de múltiples componentes que degrada la pared celular comprende además un tampón o sistema de tampón que mantiene el pH en el intervalo de 5 a pH 7,8, un agente osmótico, o una combinación de ambos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa de producción (etapa b) comprende digerir la planta o materia vegetal usando la mezcla enzimática multicomponente que degrada la pared celular para producir una fracción digerida y la etapa de recuperación (etapa c) comprende filtrar la fracción digerida para producir una fracción filtrada y recuperar las proteínas derivadas de la plantas, o proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la mezcla enzimática multicomponente que degrada la pared celular no incluye una o más de una lipasa, una proteasa o una pectinasa.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración de la una o más de una pectinasa está entre el 0,01 % v/v y el 2,5 % v/v o en el que la concentración de la una o más de una celulasa está entre el 0,1 % al 5 % p/v.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que, en la etapa de obtención (etapa a), la planta se transforma con una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas, o proteínas de supraestructura, seleccionadas del grupo de un péptido, una proteína, una roseta proteica, un complejo proteico, un proteasoma, un metabolón, un complejo de transcripción, un complejo de recombinación, un complejo fotosintético, un complejo de transporte de membrana, un complejo de poro nuclear, una nanopartícula proteica, una glucoproteína, un anticuerpo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal monocatenario, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, una proteína de cápside viral, y una proteína de cubierta viral, una proteína quimérica, un complejo de proteína quimérica, una nanopartícula de proteína quimérica, una glucoproteína quimérica, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal quimérico monocatenario, una hemaglutinina quimérica, una proteína de envoltura viral, una proteína estructural viral, un virus proteína de la cápside, y una proteína de cubierta viral, y la planta o la materia vegetal se cosecha.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico se introduce en la planta de una manera transitoria o en el que el ácido nucleico está integrado de forma estable dentro de un genoma de la planta.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en la etapa de obtención (etapa a), la planta se cultiva y la planta o materia vegetal se cosecha, o en el que el método comprende además una etapa d) de purificación de las proteínas derivadas de plantas, o supraestructuras de proteínas, a partir de la fracción apoplásica.
10. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que el ácido nucleico codifica un anticuerpo monoclonal o

una hemaglutinina de influenza.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las proteínas derivadas de plantas, o las proteínas de supraestructura no incluyen neuraminidasa o proteína M.
- 5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la materia vegetal son hojas.
13. El método de la reivindicación 4, que comprende además una etapa d) de separar las proteínas o proteínas de supraestructura, en la fracción filtrada de los restos celulares y materiales insolubles o d) de purificación
- 10 de las proteínas derivadas de plantas o las proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la etapa de separación se realiza por centrifugación o en el que la etapa de separación se realiza mediante filtración en profundidad.
- 15 15. El método de la reivindicación 9 o 13, en el que la etapa de purificación comprende filtrar la fracción usando filtración en profundidad para producir un extracto clarificado, seguido de cromatografía del extracto clarificado usando cromatografía de exclusión por tamaño, resina de intercambio catiónico o cromatografía de afinidad, o una combinación de los mismos.

Figura 1:

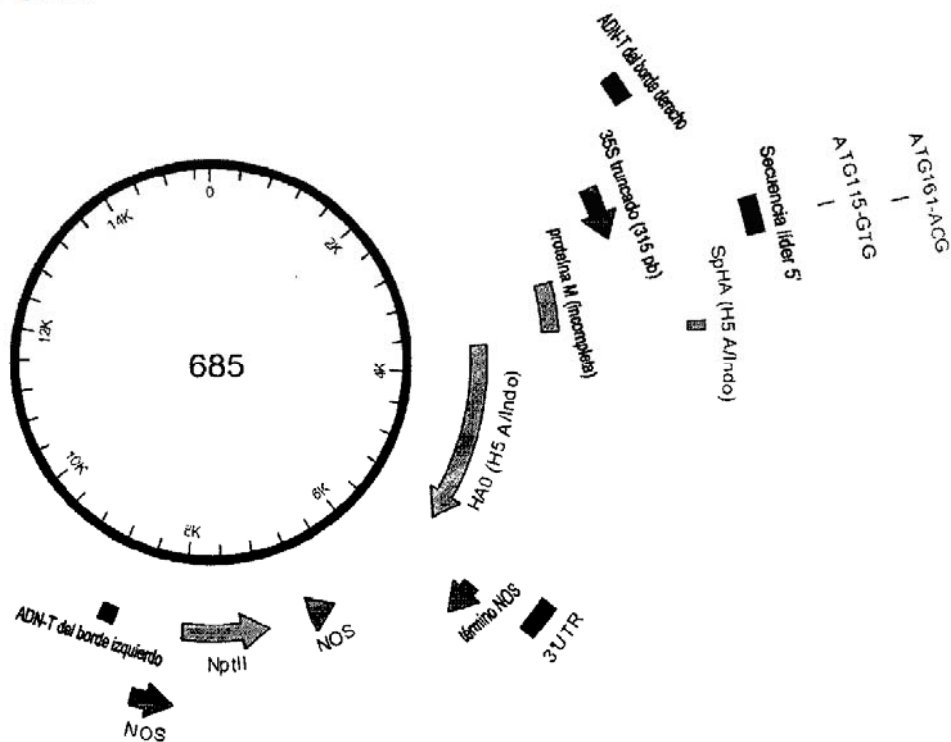


Figura 2A

TTAATTAAGAAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACCTTTA
 TTGAGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATC
 GTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAA
 AGAAGACGTTCCAACCACGCTCTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATG
 ACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGT
 ATTAATAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACTTCTCTAAACTC
 TCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGAT
 CGTGCTTCGGCACCAAGTACAACGTTTTCTTTCTACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTA
 GTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTG
 CTGGAGGCTGCTGTTACAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATC
 TCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAA
 GAAATCTAGTATTTTCTTGAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCT
 TCTGTATATTTCGCCCAAATTTGTGCGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCT
 TGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCA
 TGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGC
 GATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCC
 AATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATG
 ACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAT
 TTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA
 GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACA
 TACCAACAATAAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAAATICA
 CCATCTCTATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCATATATTTCATTGGGA
 CATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGGA
 AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAATTTTC
 ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGA
 ATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGCGGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA
 ACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAACA
 GGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAGAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAG
 GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAG
 GGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCA
 ACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAAGG
 AGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTATAATGCCGAAT
 TCTGGTTCTCATGGAATAAGAGAACTCTAGACTTTCTAGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAA
 GGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAT
 GTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCA
 AGATTAAGAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCAAACTACTGTCAAT
 TTAATCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTATGGATGTGCTC
 CAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTC
 GGTGTGCATTCTATGTTTGGTGAGCGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTTTATTTTATGTAATTTAATTT
 CTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTATTAATAA
 AAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
 AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAAATTTCTGTTGAATT
 ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAG
 TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCG
 CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGGCGCGCC

Figura 2B

MEKIVLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLILRDCS
 VAGWLLGNPMCMDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLISRINHFEEKIIPKSSWSDHEASS
 GVSSACPYLGSFRRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNNTQEDLLVLWGIHHPNDAAEQIRLYQNPTTYSIG
 TSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGN
 CNTKCCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKSRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIGFIEGGWQ
 GMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNIIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKM
 EDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNCGCFEYHKCDNECMESIR
 NGTYNPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCNSGSLQCRICI

Figura 3A

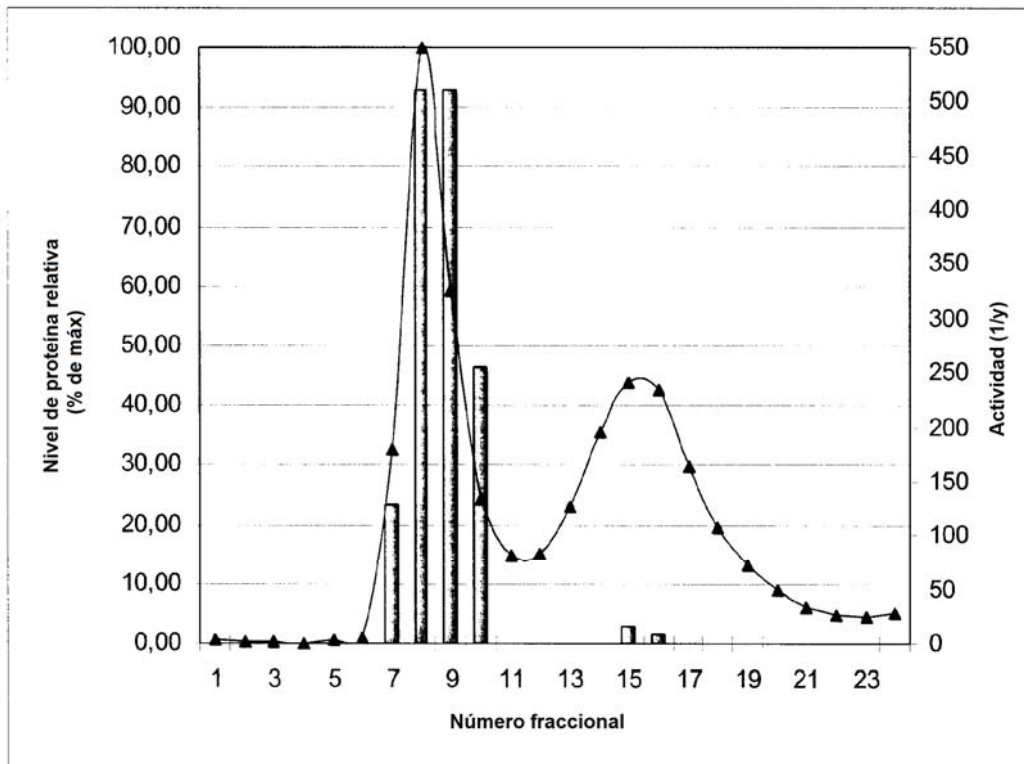


Figura 3B

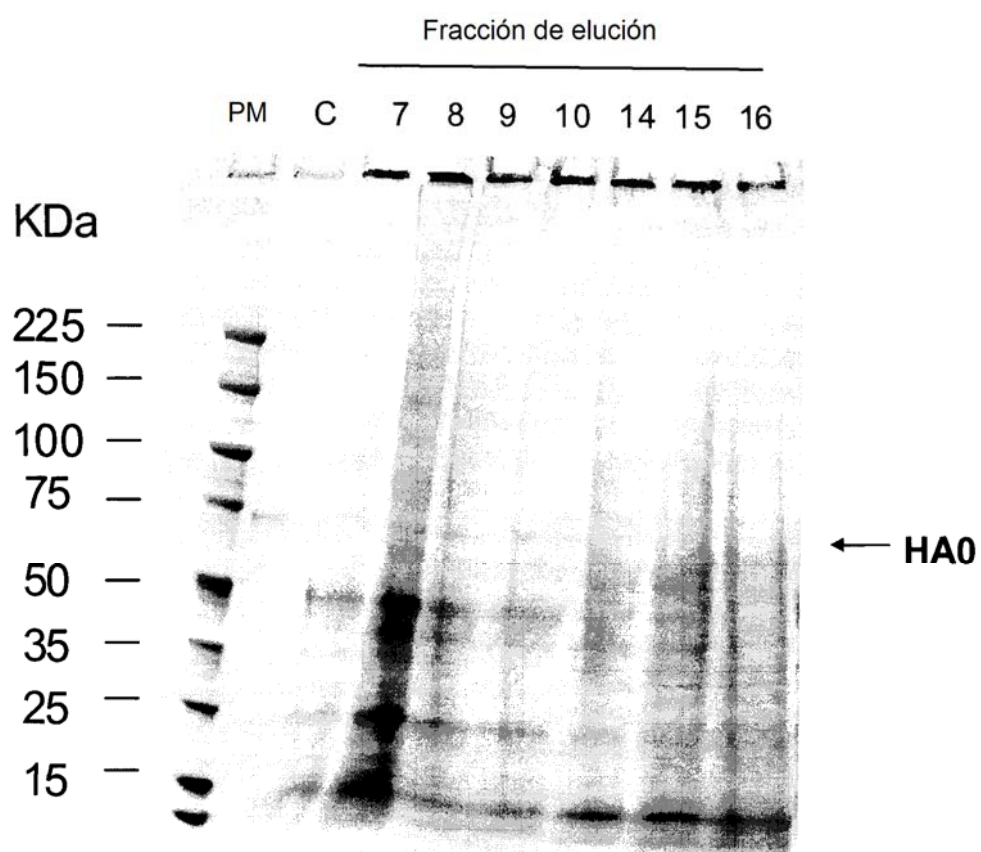


Figura 4

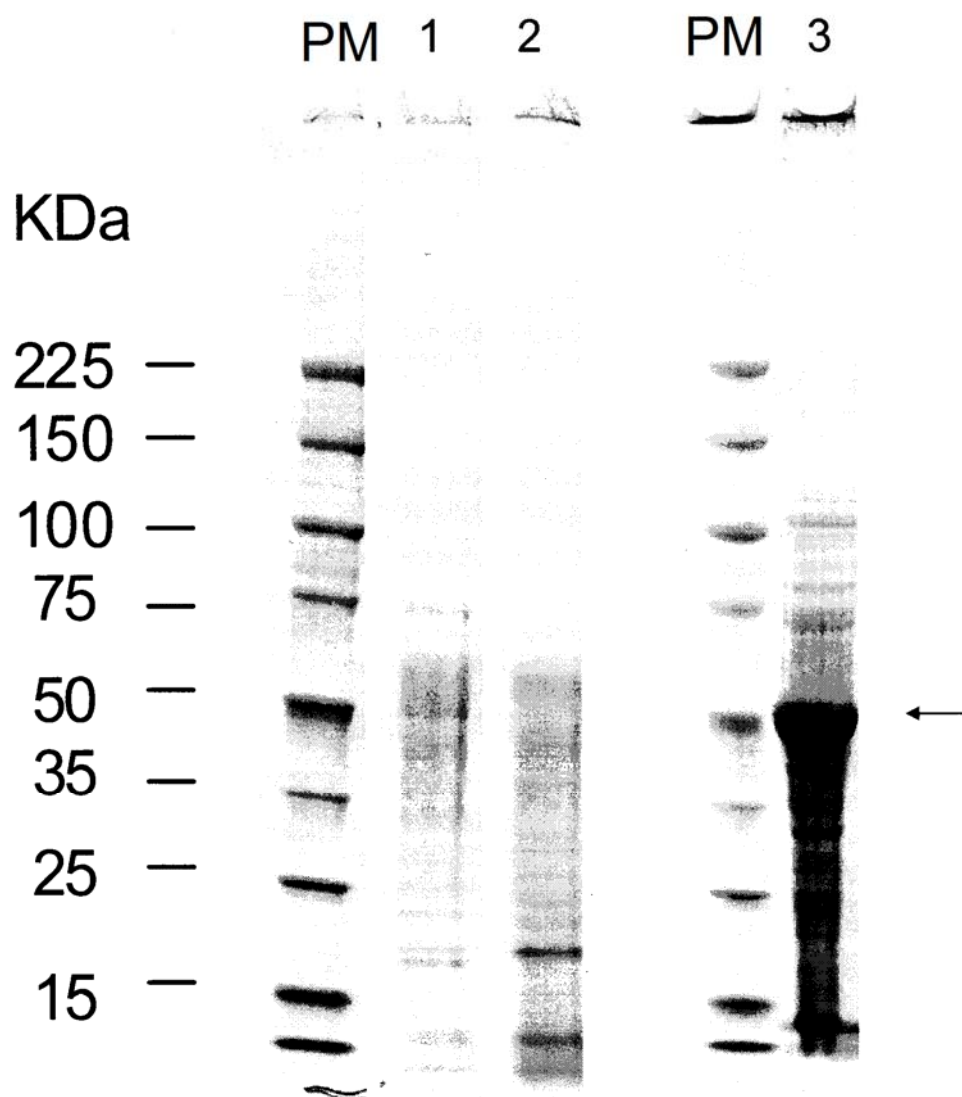
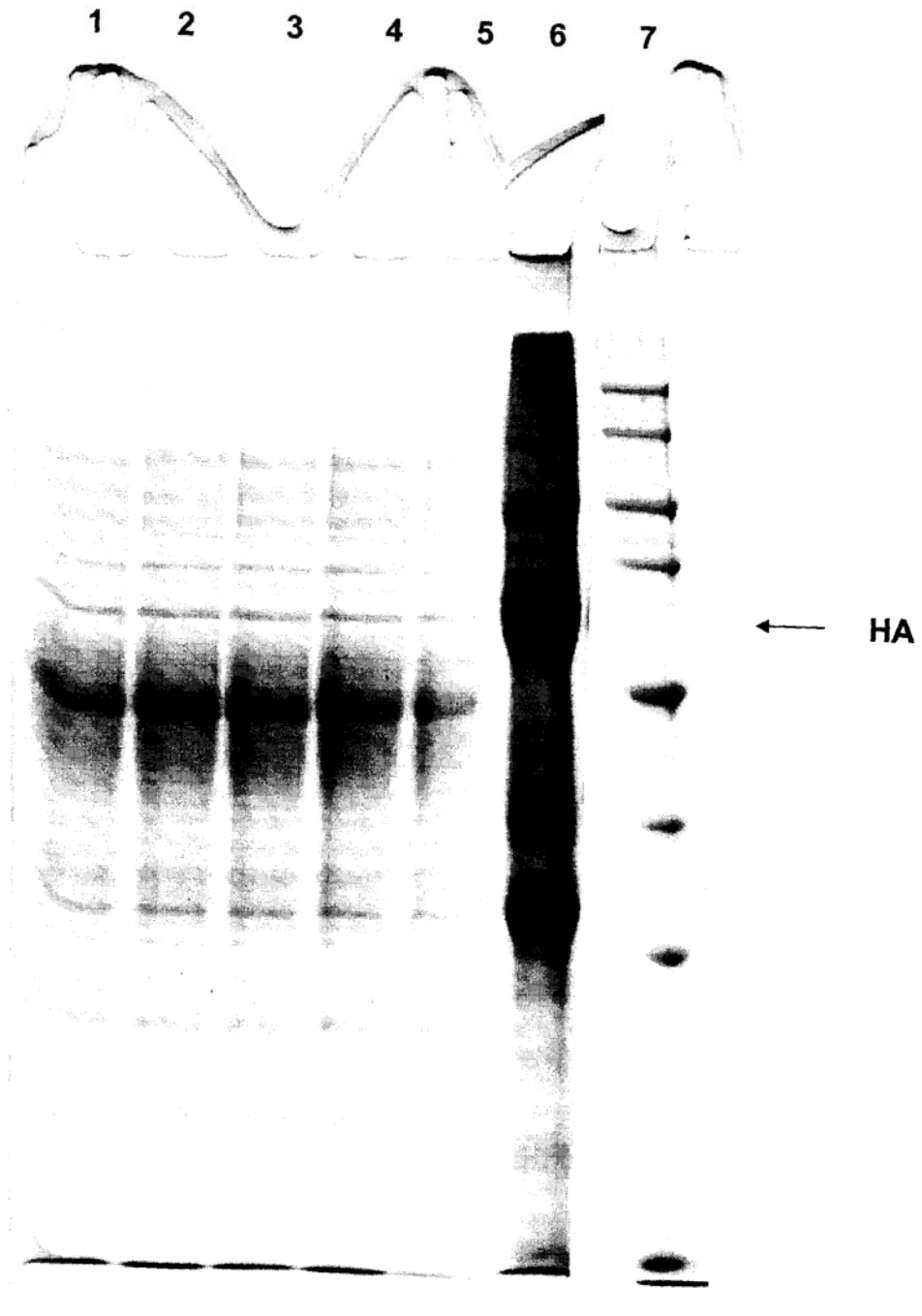


Figura 5

AGAGGTACCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAGTTAGC
 AAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAG
 AGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTG
 AGAAAAATTTGTTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAA
 TAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATAT
 CATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCAT
 TAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAATAAATTATTTTTAAAAAT
 TAAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTG
 TATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
 GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
 AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGA
 TAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGC
 ACATCTACATTATCTAAATCACACATTCTTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTT
 ATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTACACTTTGATTCCCTTCAAAACACATACAAAGA
 GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAGAAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATA
 GTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAACAATTCAACAGAGCAGGTTGAC
 ACAATCATGGAAGAAGACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAGAAGACACAAACGGGAA
 GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGG
 GAACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAAGAAGGCCAATCCAA
 CCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATA
 AACCATTTTGAGAAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTT
 AGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCTTTTGAAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC
 AGTACATACCCAACAATAAAGAAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGG
 AATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCAACCACCTATATTTCCAT
 TGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAA
 GTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGA
 AATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGA
 ATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT
 TCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAATCAAAACAGATTAGTCCTTG
 CAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTAT
 AGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG
 AGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCAACCAATAA
 GGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAG
 AAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCC
 GAATTTCTGGTTCTCATGGAAGATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTAC
 GACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA
 CAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTCAGAAG
 AAGCAAGATTAAGAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAATTTGGAATCAATAGGAACTACCAAAATACT
 GTCATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGAT
 GTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCT
 CCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTGTTA
 TGAAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAG
 AATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATA
 AAATTGAACATCTTTTGCCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATA
 GATTAATAATGGAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTAATTT
 TATATCATCCCCTTGATAAATGATAGTACA

Figura 6



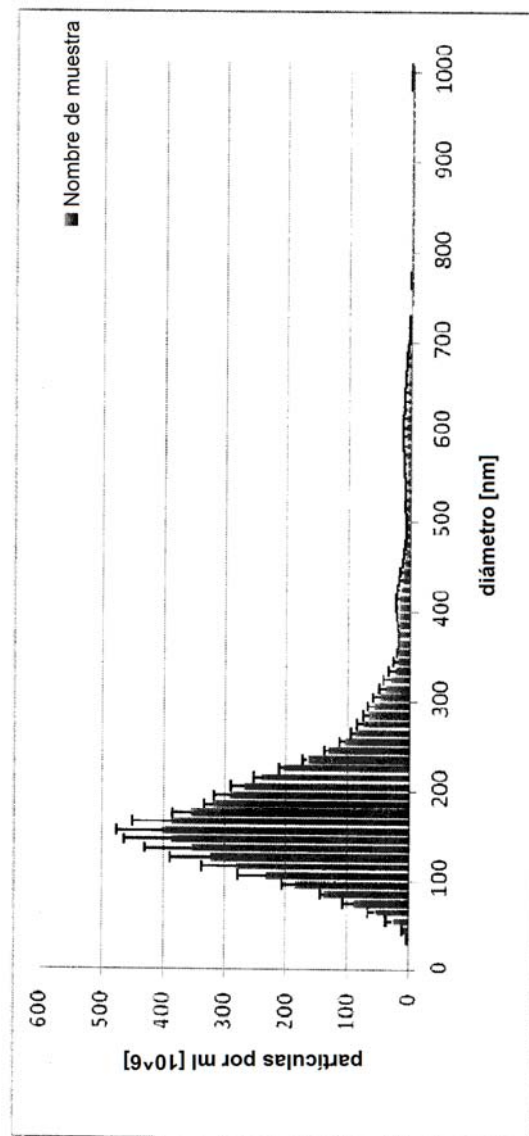


Figura 7A

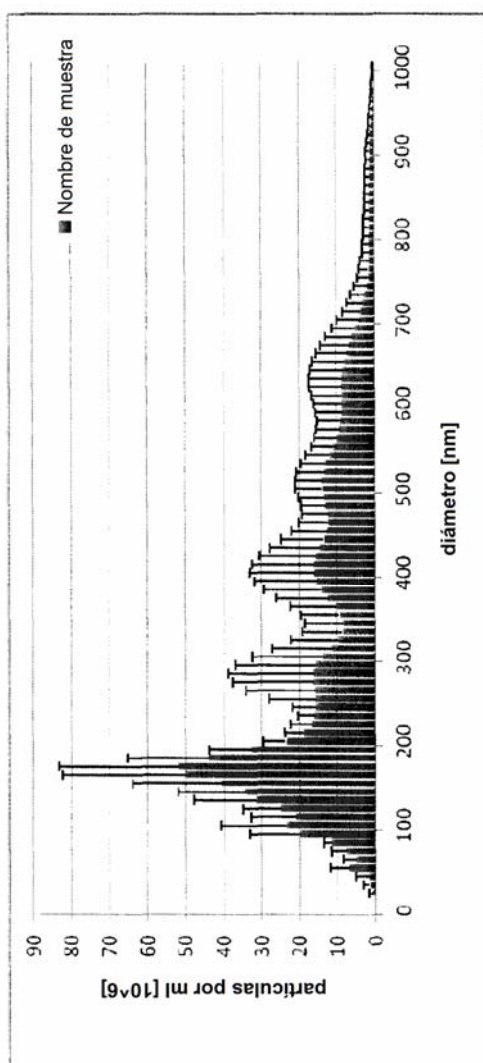


Figura 7B

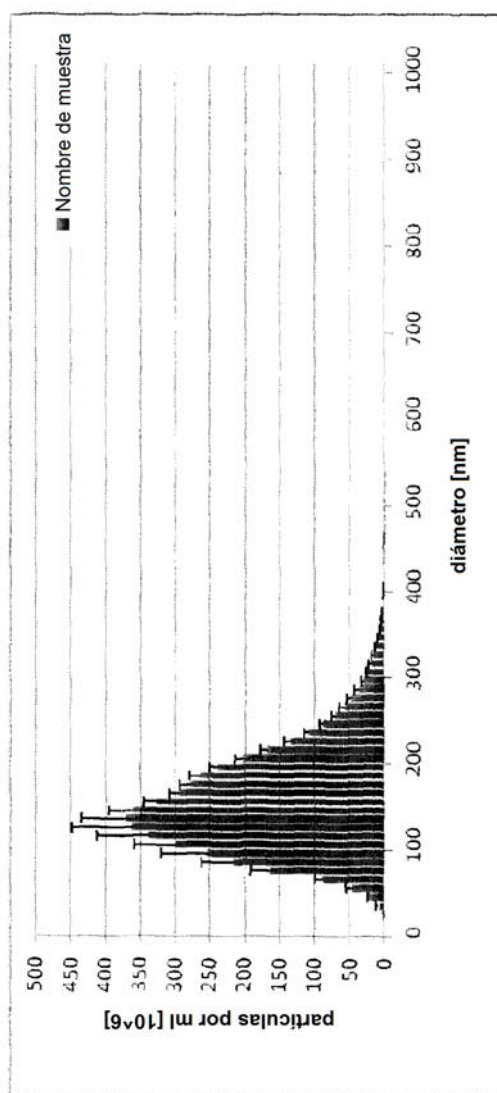
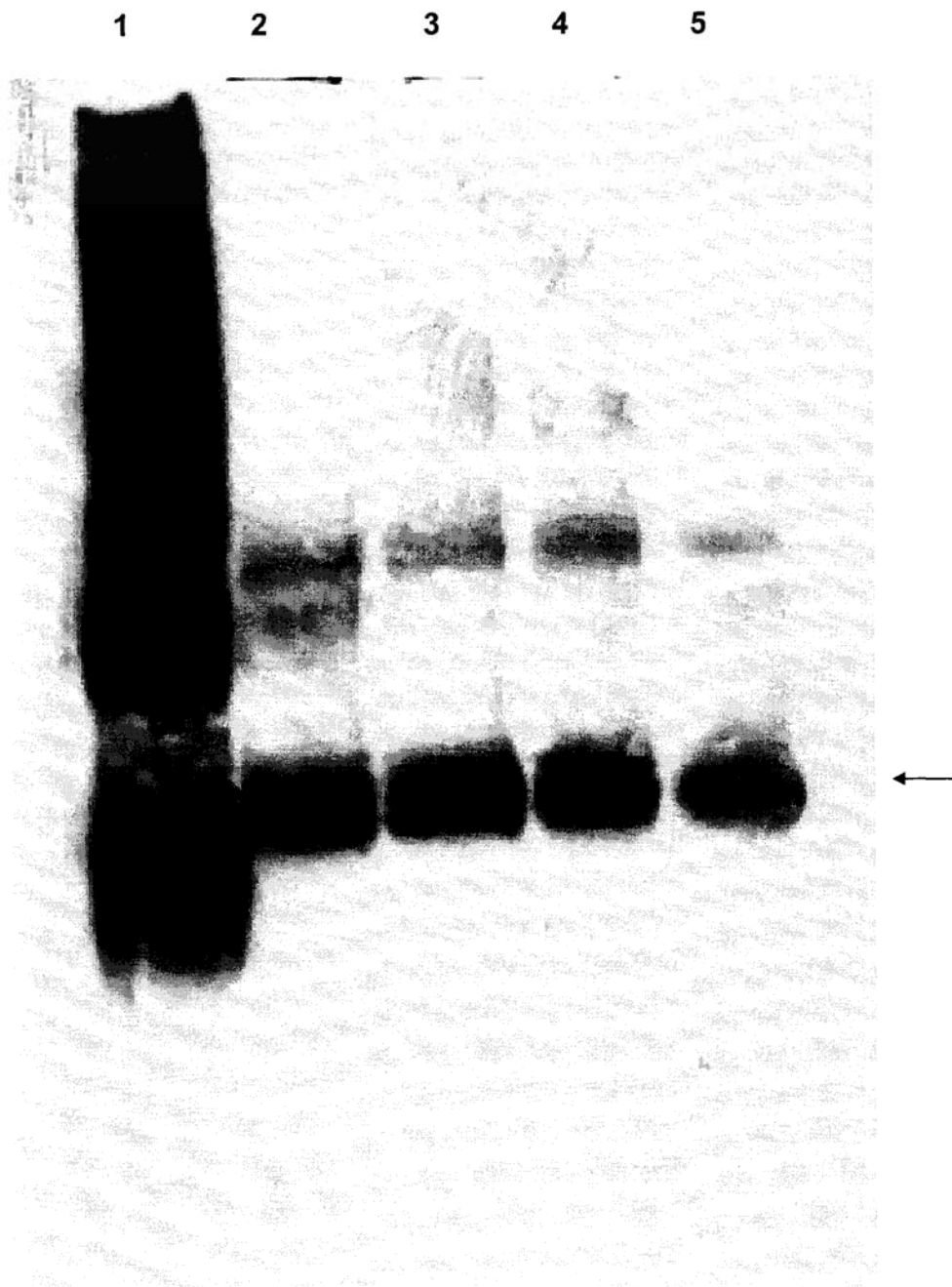


Figura 7C

Figura 8



CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAG
CTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCC
CAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCA
GGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
CCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGC
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGG
CTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTT
CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAGACGTCGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTT
ATAATATGGTTTGTATTTGTTAATTTTGTTCCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGT
TGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTA
CATAAGTGGAGTCAGAAATCAGAAATGTTTCCTCCATAACTAACTAGACATGAAGAC
CTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAATAAAATTGAACATCTTTTGCCA
CAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAA
TAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAAT
ACTAATTTTATATCATCCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGA
ATTC

N.º 590 (Fragmento LC; SEQ ID NO.15)

Figura 9

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAA
 TTAATCATCTTGAGAGAAAATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTCGCTGTTGCTACGC
 GTGTCCTGTCCCAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
 AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGAC
 ACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCTACAATC
 AGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC
 AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGA
 CTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
 CGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGA
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
 CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
 AAAGGGCAGCCTAGGGAACCACAAGTGTACACTCTTCCACCATCTAGGGATGAGCTTACTAAGAA
 CCAAGTTTCTCTTACTTGTCTTGTGAAGGGATTTTATCCATCTGACATCGCCGTGGAATGGGAAT
 CCAACGGACAACCAGAGAACAATTACAAGACTACTCCACCAGTTCTTGATTCTGATGGATCCTTC
 TTTCTTTATTCCAAGCTTACTGTTGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGAAATGTGTTCTCTTGTTT
 TGTTATGCACGAAGCTCTTCATAATCATTATACTCAAAGTCCCTTTCTCTTCTCTCTGGAAGT
 GAGACGTGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGT
 CTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGT
 AATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCCTCCATAACTAAGTACATG
 AAGACCTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATTGAACATCTTTTGCCACAAC
 TTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAG
 TTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTACTAATTTTATATCATCCCCCTTGA
 TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGAATTC

N.º 592 (Fragmento HC; SEQ ID NO: 16)

Figura 10

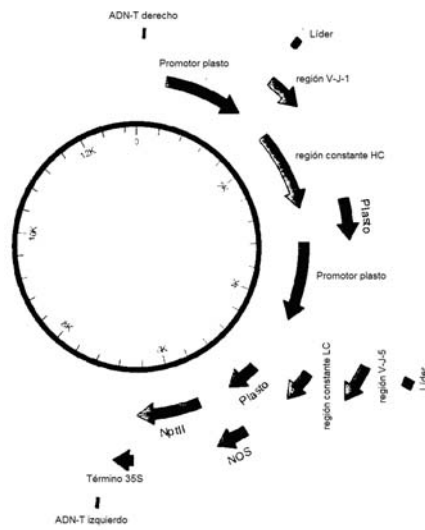


Figura 11A

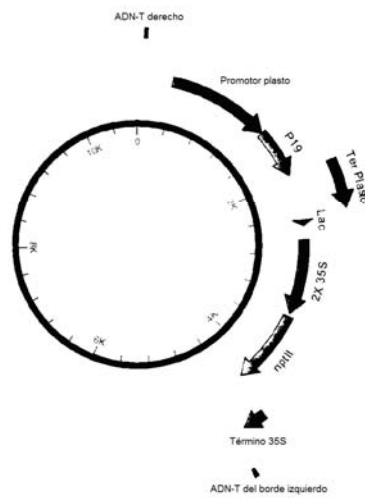


Figura 11B

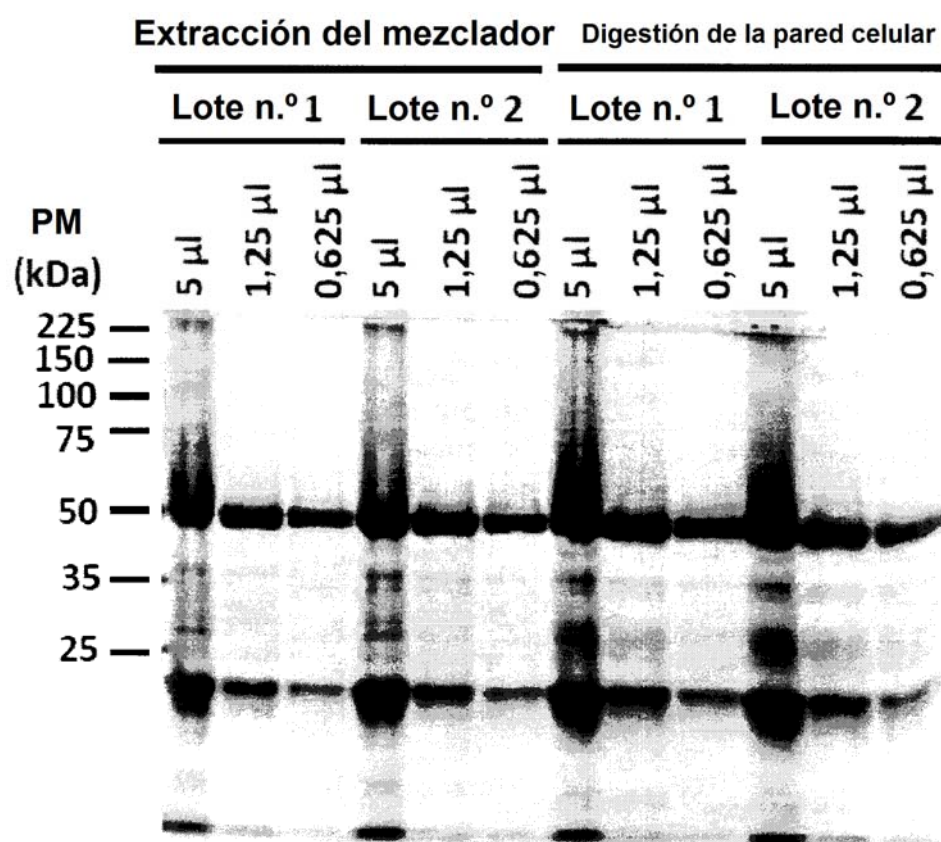
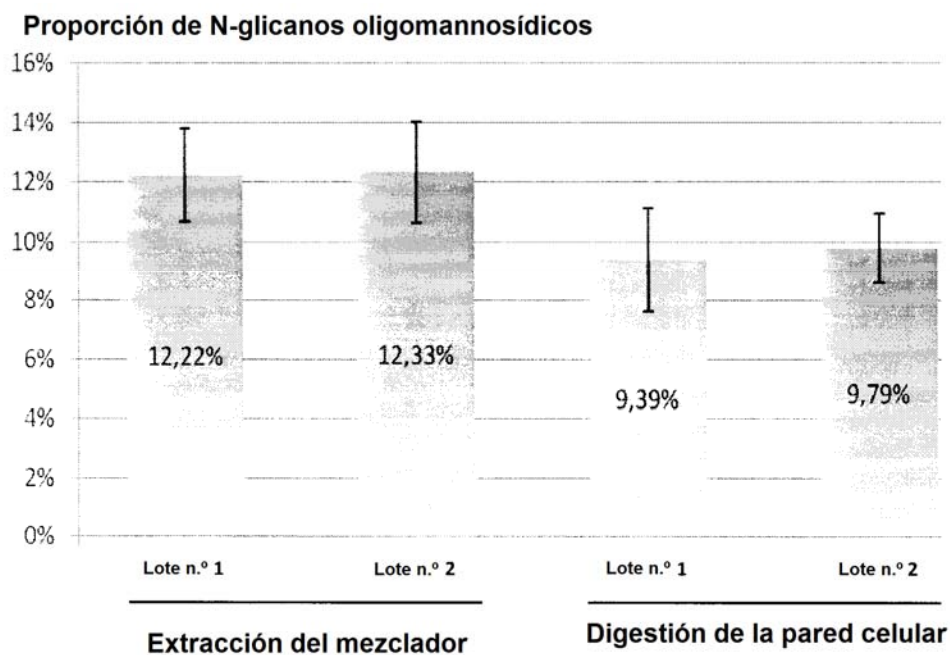


Figura 12



Análisis estadístico

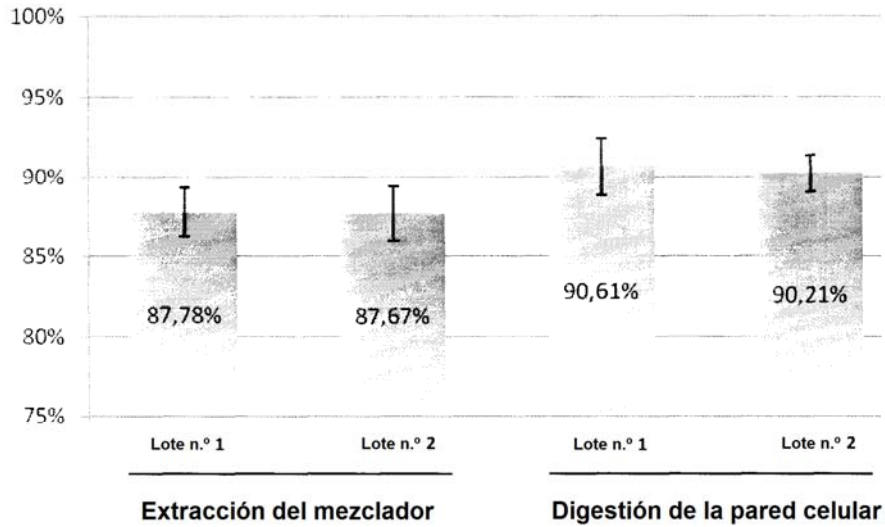
valor de p	Mezclador, Lote n.º 1	Digestión, Lote n.º 1	Mezclador, Lote n.º 2
Digestión, Lote n.º 1	$3,3 \cdot 10^{-4}$ (***)		
Mezclador, Lote n.º 2	1 (idéntico)	$1,9 \cdot 10^{-4}$ (***)	
Digestión, Lote n.º 2	$2,39 \cdot 10^{-3}$ (**)	1 (idéntico)	$1,41 \cdot 10^{-3}$ (**)

**: La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es muy significativa (valor de p entre 0,01 y 0,1).

***: La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es altamente significativa (valor de p entre 0 y 0,01).

Figura 13A

Proporción de N-glicanos complejos



Análisis estadístico

valor de p	Mezclador, Lote n.º 1	Digestión, Lote n.º 1	Mezclador, Lote n.º 2
Digestión, Lote n.º 1	$3,3 \cdot 10^{-4}$ (***)		
Mezclador, Lote n.º 2	1 (idéntico)	$1,9 \cdot 10^{-4}$ (***)	
Digestión, Lote n.º 2	$2,39 \cdot 10^{-3}$ (**)	1 (idéntico)	$1,41 \cdot 10^{-3}$ (**)

**: La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es muy significativa (valor de p entre 0,01 y 0,1).

***: La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es altamente significativa (valor de p entre 0 y 0,01).

Figura 13B