

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 066**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/14** (2006.01)

**C07K 14/415** (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: **23.03.2012 PCT/CA2012/050180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12126123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 12759964 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2688903**

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

30 Prioridad:

**23.03.2011 US 201161466889 P**

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

**18.09.2018**

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (100.0%)  
1020 route de l'Eglise Suite 600  
Québec, Québec G1S 3M7, CA**

72 Inventor/es:

**COUTURE, MANON;  
PAQUET, DANY y  
VEZINA, LOUIS-PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CAMPello ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 682 066 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 recuperación de proteínas derivadas de plantas

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para la recuperación 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 insecto, y cultivo de células de mamífero, expresan y secretan proteínas a un nivel muy alto en los medios de cultivo.

15

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

Se usan ampliamente diferentes enfoques 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 proteína o 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 en su evolución como productos bioterapéuticos y en el mercado general de ciencias de la vida. La IgG monoclonal terapéutica (anticuerpos monoclonales, mAbs) domina el mercado actual de nuevos fármacos antiinflamatorios y anticancerosos, y actualmente se encuentran en fase de investigación y desarrollo clínico cientos de nuevos candidatos 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 al 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 compartimento 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 1993 (J. Immunol. Methods 226:1-10) describen la expresión y la purificación del anticuerpo recombinante específico de TMV, que varía en tamaño desde 35-66 kDa, a partir de un cultivo de suspensión de tabaco transgénico. Las suspensiones celulares que expresan rAb24 se suspendieron en tampón de extracción que contenía pectinasa (con EDTA 5 mM). La Publicación PCT WO 2011/035423 (de Vezina et al) describe la purificación de proteínas o supraestructuras de

50

55

proteínas de plantas mediante filtración al vacío para la agroinfiltración seguida de un procedimiento de centrifugación.

Pueden emplearse partículas pseudovíricas (VLP) pueden emplearse para preparar vacunas, tales como vacunas  
 5 contra la gripe, por ejemplo. 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  
 10 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).  
 15 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 trímeros de HA), y son capaces de activar la respuesta inmunitaria tanto humoral como celular. (Bright, R.A., et. al., 2007, *Vaccine* 25, 3871-3878).

20 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 conserve 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 fitoesteroles en la envoltura), y puede contribuir a una respuesta inmunitaria mejorada.

25 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 parenteral (Huang et al., 2005, *Vaccine* 23, 1851-1858) pero la inmunización oral a través de  
 30 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.

35 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  
 40 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).

45 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  
 50 campo, y no requieren métodos y manipulación de cultivo de tejidos asépticos.

Se desean métodos de recuperación de proteínas o supraestructuras de proteínas que estén sustancialmente libres de, o se puedan separar fácilmente de las proteínas vegetales, pero que conserven las características estructurales de las proteínas o las supraestructuras de proteínas.

55 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un método de recuperación de partículas pseudovíricas (VLP) o supraestructuras de proteínas de plantas o materia vegetal, que comprende:

- a. obtener la planta o materia vegetal que comprende VLP localizadas en apoplasto o supraestructuras de proteínas localizadas en apoplasto, teniendo las supraestructuras de proteínas localizadas en apoplasto un peso molecular de 75 a 1500 kDa;
- 5 b. tratar la planta o materia vegetal con una composición que comprende EDTA o EGTA de aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mM, para aflojar la pared celular para producir una planta o materia vegetal que tenga una pared celular aflojada para obtener una mezcla de incubación de planta, y separar la mezcla de incubación de planta para producir una fracción de células vegetales y una fracción apoplásica; y
- 10 c. recuperar las VLP o las supraestructuras de proteínas de la fracción apoplásica.

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

- 15 Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para recuperar proteínas derivadas de plantas.

La presente invención proporciona un método (A) para preparar proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, que comprende obtener una planta o materia vegetal que comprende las proteínas derivadas de las plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, localizadas dentro del apoplasto; tratar la planta o materia vegetal para aflojar la pared celular para producir una fracción de contenido apoplásico y una fracción de célula vegetal, comprendiendo la fracción de contenido apoplásico proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura; y recuperar la fracción de contenido apoplásico. El método puede comprender además una etapa de purificación de las proteínas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura, de la

20 fracción de contenido de apoplastos. Las proteínas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden ser proteínas quiméricas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura. Las proteínas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden ser heterólogas a la planta. Las proteínas derivadas de plantas, 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

25 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 (VLP), 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,

30 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 La fracción de contenido apoplásico, y la fracción celular pueden producirse tratando la planta o la materia vegetal de manera química, enzimática, física o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la planta o materia vegetal se puede tratar con una composición de aflojamiento de la pared celular. La composición de aflojamiento de la pared celular puede comprender uno o más de un compuesto seleccionado de un quelante, un radical hidroxilo, ácido

45 indol-3-acético, expansina, pectinasa, celulasa, lipasa, proteasa y una combinación de los mismos. Como se entenderá por un experto, la celulasa es una mezcla de enzimas y puede incluir una o más endo-1,4-beta-glucanasas, celobiohidrolasas (exocelulasas), beta-glucosidasas, celobiosa deshidrogenasas (celulasa oxidativa), fosforilasas de celulosa, y hemicelulasas.

50 Además, la fracción de contenido apoplásico y la fracción celular pueden producirse infiltrando la composición de aflojamiento de la pared celular mediante infiltración a presión o al vacío en la planta o materia vegetal. Más específicamente, la composición de aflojamiento de la pared celular puede comprender una o más enzimas, por ejemplo, una o más de una pectinasa, una o más de una celulasa, o una o más de una pectinasa y una o más de una celulasa. Por lo tanto, la fracción de contenido apoplásico y la fracción celular pueden producirse, por ejemplo,

55 mediante infiltración enzimática.

La fracción de contenido apoplásico, y la fracción celular también se pueden producir tratando la planta o la materia vegetal mediante sonicación, o con una composición de aflojamiento de la pared celular combinada con sonicación.

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 células vegetales, hojas, tallos, raíces o células vegetales cultivadas.

- 5 La presente invención proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura, como se ha descrito anteriormente, en el que un ácido nucleico que codifica las proteínas derivadas de plantas, 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.
- 10 La presente invención también proporciona un método para preparar proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, como se ha descrito anteriormente, que comprende además una etapa de purificación de las proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, de la fracción de contenido apoplásico. La etapa de purificación puede comprender filtrar la fracción de contenido de apoplastos utilizando filtración en profundidad para producir un extracto clarificado, seguido de cromatografía del extracto clarificado
- 15 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 de la fracción de contenido apoplásico son más homogéneas, ya que las formas intermedias de las proteínas modificadas postraduccionamente, o las

20 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 incluyendo mayor potencia, semivida más larga, o mejor capacidad inmunogénica. Por ejemplo, las proteínas sanguíneas que

25 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 de contenido apoplásico muestra glucosilación de tipo más compleja. Por lo tanto, una proteína preparada utilizando los métodos descritos en el presente documento, que implican el aflojamiento de la pared celular, muestra, por ejemplo, una mejor semivida en circulación.

30 Las proteínas derivadas de plantas, proteínas, 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 química, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, o

35 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, o una o más de una célula vegetal, hojas, tallos, raíces o células cultivadas.

40 La presente invención también proporciona un método (B) para preparar proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, que comprende obtener una planta o materia vegetal que comprende proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, tratar la materia vegetal usando una composición de aflojamiento de la pared celular, sonicación o una combinación de los mismos, para producir una fracción de células

45 vegetales y una fracción de contenido apoplásico, y filtrar la fracción de contenido apoplásico para producir una fracción filtrada y recuperar las proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada.

Sin desear quedar ligado por la teoría, las VLP hechas de plantas que comprenden lípidos derivados de plantas,

50 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

55 componentes intercelulares e intracelulares, junto con una proteína o supraestructura de interés que se aislará. La preparación de una fracción de contenido apoplásico, seguida de una etapa para segregar los componentes de la pared celular junto con las proteínas y componentes intracelulares es ventajosa, ya que la proteína o supraestructura de interés puede enriquecerse y aumentar la eficacia dentro de un proceso de fabricación. El disponer de 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 aflojamiento de la pared celular obtiene un rendimiento de proteínas de supraestructura similar o mayor en comparación con los métodos que implican paredes celulares digeridas (por ejemplo, como se describe en los documentos PCT/CA2010/001489, o PCT/CA2010/001488). Sin desear quedar ligado a la teoría, la etapa de aflojamiento de la pared celular puede  
 5 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.

Los métodos descritos en el presente documento dan como resultado menos interrupción, y contaminación de un  
 10 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 de contenido apoplásico del tejido de la planta mientras se mantiene 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  
 15 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  
 20 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 de contenido apoplásico puede ser ventajosa, ya que las fracciones de contenido apoplásico son significativamente reducidas, o están 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  
 25 de supraestructura, en la fracción de contenido apoplásico 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 aflojan la pared celular, por ejemplo, las plantas extraídas del mezclador. Se ha  
 30 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).  
 35

Mediante el aflojamiento de la pared celular, puede ser posible liberar un grupo de anticuerpos apoplásicos que  
 40 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 glucosilados que llevan N-glicanos complejos, separando las formas inmaduras de los anticuerpos glucosilados 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.  
 45

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.  
 50

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  
 55 escala.

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.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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:

- 10 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.
- La **Figura 2** muestra A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO. de una porción de construcción para expresar H5/Indo (construcción número 685) desde Pacl (aguas arriba del promotor 35S) hasta Ascl (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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 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).
- 30 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 realizaron 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.
- 35 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 + NaPO<sub>4</sub> 75 mM + EDTA 25 mM + bisulfito al 0,04 % pH 6,2, Carril 3) Manitol 600 mM + citrato 125 mM + NaPO<sub>4</sub> 75 mM + EDTA 50 mM + bisulfito al 0,04 % pH 6,2, Carril 4) Manitol 200 mM + citrato 125 mM + NaPO<sub>4</sub> 75 mM + EDTA 25 mM + bisulfito al 0,03 % pH 6,2, Carril 5) Manitol 200 mM + citrato 125 mM + NaPO<sub>4</sub> 75 mM + EDTA 50 mM + bisulfito al 0,03 % pH 6,2. La flecha representa la señal de inmunodetección de HA0.
- 40
- 45
- 50
- 55

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).

5 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.

**Figura 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.

10 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.

15 La **Figura 14A** muestra un modelo (modelo reticulado covalentemente) de una pared celular de planta. En este modelo, los polímeros de la matriz de la pared celular (xiloglucano, pectina y glicoproteína) están unidos covalentemente entre sí. La unión de xiloglucano a microfibrillas de celulosa da como resultado una red de celulosa-hemicelulosa reticulada no covalentemente que proporciona resistencia a la tracción a la pared. La **Figura 14B** muestra un modelo alternativo (modelo de atadura) de una pared celular vegetal. En este modelo, las moléculas de xiloglucano están unidas por hidrógeno a y reticulan microfibrillas de celulosa. La red de celulosa-xiloglucano está mallada en una red péctica reticulada no covalentemente. La **Figura 14C** muestra otro modelo alternativo (modelo de capa difusa) de una pared celular vegetal. En este modelo, las moléculas de xiloglucano están unidas por hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa, pero no las reticulan directamente. El xiloglucano firmemente unido está rodeado por una capa de polisacáridos unidos menos firmemente. La celulosa y el xiloglucano están incrustados en una matriz péctica. La **Figura 14D** muestra un modelo alternativo (modelo de capa estratificada) de una pared celular vegetal. En este modelo, las moléculas de xiloglucano están unidas por hidrógeno a y reticulan microfibrillas de celulosa. Las lamelas de celulosa-xiloglucano están separadas por estratos de polisacáridos pécticos.

20 La **Figura 15** muestra la proteína liberada tras el tratamiento de la planta con tampón que contiene EDTA, con o sin el uso de enzimas de despolimerización de la pared celular. **Figura 15A** La concentración de proteína se midió usando el ensayo de Bradford. **Figura 15B** La actividad de HA se expresa como la inversa de la menor cantidad de proteína extraíble para glóbulos rojos hemaglutinantes.

25 La **Figura 16A** muestra la proteína liberada después de 4 horas (Tiempo 0,25 t) de hojas que se han infiltrado con una solución enzimática/solución de digestión (véase el Ejemplo 17), en comparación con hojas que se han empapado y agitado en la misma solución enzimática/solución de digestión durante 16 horas (tiempo t). La **Figura 16B** muestra la proteína liberada de una planta entera/hojas infiltradas con una solución enzimática/solución de digestión en comparación con hojas cortadas infiltradas con la misma solución enzimática/solución de digestión. La **Figura 16C** muestra la proteína liberada tras el tratamiento de hojas enteras con una o más pectinasas (por ejemplo, Biocatalysts 162L y/o Biocatalysts 444L) con o sin el uso de Multifect CXCG y Multifect CX B (Genencor). Además, se muestra la liberación de proteínas tras tratar hojas enteras con Biocatalysts PDN33. La **Figura 16D** muestra la proteína liberada tras tratar hojas enteras después de 5 días con un tampón a pH 5,8, pH 6,0 o pH 6,2 o después de tratar hojas enteras después de 7 días después de la agroinfiltración con diversos tampones a pH 6,2 o pH 6,5.

30 La **Figura 15** muestra la proteína liberada tras el tratamiento de la planta con tampón que contiene EDTA, con o sin el uso de enzimas de despolimerización de la pared celular. **Figura 15A** La concentración de proteína se midió usando el ensayo de Bradford. **Figura 15B** La actividad de HA se expresa como la inversa de la menor cantidad de proteína extraíble para glóbulos rojos hemaglutinantes.

35 La **Figura 16A** muestra la proteína liberada después de 4 horas (Tiempo 0,25 t) de hojas que se han infiltrado con una solución enzimática/solución de digestión (véase el Ejemplo 17), en comparación con hojas que se han empapado y agitado en la misma solución enzimática/solución de digestión durante 16 horas (tiempo t). La **Figura 16B** muestra la proteína liberada de una planta entera/hojas infiltradas con una solución enzimática/solución de digestión en comparación con hojas cortadas infiltradas con la misma solución enzimática/solución de digestión. La **Figura 16C** muestra la proteína liberada tras el tratamiento de hojas enteras con una o más pectinasas (por ejemplo, Biocatalysts 162L y/o Biocatalysts 444L) con o sin el uso de Multifect CXCG y Multifect CX B (Genencor). Además, se muestra la liberación de proteínas tras tratar hojas enteras con Biocatalysts PDN33. La **Figura 16D** muestra la proteína liberada tras tratar hojas enteras después de 5 días con un tampón a pH 5,8, pH 6,0 o pH 6,2 o después de tratar hojas enteras después de 7 días después de la agroinfiltración con diversos tampones a pH 6,2 o pH 6,5.

#### 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

50 La siguiente descripción es de una realización preferida.

La presente invención proporciona un método para recuperar proteínas derivadas de plantas o supraestructuras 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 implica aflojar la pared celular, por ejemplo degradando, parcialmente degradando, escindiendo, escindiendo parcialmente o cambiando estructuralmente de otro modo los componentes poliméricos de la pared celular y sus enlaces asociados, dentro de la pared celular, rompiendo enlaces intermoleculares no covalentes o covalentes dentro de, o entre, polímeros de la pared celular. El método puede implicar o no la liberación de protoplasto o

esferoplastos de la célula vegetal.

El término "protoplasto" significa una célula vegetal que ha tenido su pared celular completamente o significativamente eliminada, por ejemplo, puede eliminarse de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 % 5, o cualquier cantidad entre la misma de la pared celular. Por ejemplo, puede eliminarse de aproximadamente el 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 100 %, o cualquier cantidad entre las mismas de la pared celular. Un esferoplasto puede tener una eliminación parcial de la pared celular, por ejemplo, puede eliminarse de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 49 %, o puede cantidad entre la misma de la pared celular. Por ejemplo, puede eliminarse de aproximadamente el 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 49 %, o cualquier cantidad entre las 10 mismas de la pared celular.

El "apoplasto" es la parte de la célula vegetal comprendida entre la membrana plasmática y la pared celular, 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 15 los protoplastos permanezcan intactos para enriquecer las proteínas, o proteínas de supraestructura como se describe en el presente documento. Preferiblemente, la membrana plasmática del protoplasto o esferoplastos no se ha degradado, parcialmente degradado, escindido, parcialmente escindido o cambiado estructuralmente de otro modo, aflojado o ha cambiado su integridad, pero, por ejemplo, puede degradarse, escindir, cambiarse estructuralmente, aflojarse o eliminarse aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 20 80, 85, 90, 95 % o cualquier cantidad entre las mismas de la membrana plasmática.

Por el término "pared celular" se entiende la estructura que forma el compartimiento celular exterior de una célula vegetal, y que se sitúa fuera de la membrana plasmática, bordeando el apoplasto. Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que la pared celular está hecha de una matriz de polímeros tales como microfibrillas de celulosa 25 unidas por medio de ataduras hemicelulósicas para formar una red de celulosa-hemicelulosa incrustada en una matriz de pectina (véanse las Figuras 14A-14D para varios modelos de una pared celular vegetal). Los componentes de la pared celular pueden incluir, como ejemplos no limitativos, polisacáridos, celulosa, hemicelulosa (tal como xilano, xiloglucano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucuronarabinoxilano, manano, glucomanano, galactomanano, galactoglucomanano), pectina (tales como homogalacturonanos, ramnogalacturonanos I, ramnogalacturonanos II, oligogalacturónidos, galacturonanos sustituidos, xilogalacturonanos, apiogalacturonanos), polímeros, lignina, cutina, 30 suberina, glucoproteínas, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas de arabinogalactano, proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina, extensinas, expansinas, minerales, calcio, pectato de calcio, magnesio, pectato de magnesio, borato, ésteres fenólicos, ácido ferúlico, ácido cumárico.

Estructuralmente, los componentes de la pared celular, particularmente la red de celulosa-hemicelulosa incrustada en las formas de la matriz de pectina, contribuyen a la naturaleza semipermeable de la pared celular. En un entorno fisiológico, la pared celular normalmente permite el paso de pequeñas moléculas a través de las mallas formadas por los componentes de la pared celular. Aflojar la pared celular implica un aflojamiento de las interacciones de los componentes de la pared celular entre sí, y da como resultado, directa o indirectamente, como un agrandamiento o 40 estiramiento de las mallas, lo que permite el paso de moléculas más grandes que las que normalmente se les permitiría pasar a través de la pared celular. El paso de moléculas grandes a través de la pared celular aflojada se puede facilitar mediante fuerzas que actúan sobre el paso normal de pequeñas moléculas a través de la pared celular no aflojada, tal como, por ejemplo, la presión de turgencia, la presión osmótica y la presión hidrostática. El presente método puede incluir el uso de reactivos, productos químicos o biológicos, que actuarán sobre una o más 45 de esas fuerzas para facilitar aún más el paso de moléculas grandes.

Por "aflojamiento de la pared celular" se entiende una modificación de la pared celular que produce cambios estructurales en la pared celular, que puede dar como resultado la relajación de la tensión de la pared, relajación de la presión de la pared, extensión irreversible de la pared (deslizamiento de la pared), o degradación, parcial o 50 completa, de uno o más componentes de la pared celular. Por ejemplo, y sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el aflojamiento de la pared celular puede surgir como resultado de la ruptura de enlaces entre diversos componentes dentro de la pared celular, por ejemplo, enlaces que soportan carga dentro de la pared celular. El cambio estructural puede tener lugar, por ejemplo, escindiendo, escindiendo parcialmente, degradando o degradando parcialmente los componentes de la pared celular, rompiendo enlaces intermoleculares no covalentes, o 55 covalentes, dentro o entre componentes de la pared celular, u otras modificaciones que debilitan la pared celular y alteran la matriz de la pared celular, o una combinación de las mismas. El aflojamiento puede producirse en regiones localizadas de la pared, en los componentes diana dentro de la pared celular, o el aflojamiento puede dispersarse en general a través de la pared celular. El aflojamiento de la pared celular, por ejemplo, puede tener lugar después del tratamiento físico de la célula vegetal, tal como sonicación, químico, enzimático, tanto tratamiento químico como

enzimático con una composición de aflojamiento de la pared celular, o una combinación de sonicación y tratamiento con una composición de aflojamiento de la pared celular, o una combinación de infiltración (usando vacío o presión) y tratamiento con una composición de aflojamiento de la pared celular. El aflojamiento de la pared celular puede provocar una digestión parcial de la pared celular. Las células vegetales que se han sometido a un tratamiento para

5 aflojar la pared celular pueden comprender la pared celular de la planta, o parte de la pared celular de la planta, en una forma modificada. Además, el aflojamiento de la pared celular puede incluir una degradación o eliminación parcial de la pared celular, tal como del 0 % a aproximadamente el 60 % o cualquier cantidad entre la misma, de la pared celular que se degrada o se elimina, del 0 % a aproximadamente el 30 % o cualquier cantidad entre la misma, de la pared celular que se degrada o elimina, o del 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85,

10 90 % o cualquier cantidad entre las mismas, de la pared celular que se degrada o elimina. Sin embargo, también pueden producirse protoplastos, esferoplastos o tanto protoplastos como esferoplastos. Algunas células vegetales dentro de una población de células después de uno o más tratamientos como se describe en el presente documento, para aflojar la pared celular, pueden comprender protoplastos, por ejemplo, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 50 %, o cualquier cantidad entre la misma, de la población celular puede comprender

15 protoplastos, por ejemplo, del 0 % a aproximadamente el 30 % o cualquier cantidad la misma, del 0 % a aproximadamente el 10 % o cualquier cantidad entre la misma, de la población celular puede comprender protoplastos, o del 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 % o cualquier cantidad entre las mismas, de la población celular puede comprender protoplastos. De forma similar, algunas células vegetales pueden comprender esferoplastos, por ejemplo, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 90 %, o cualquier cantidad entre la

20 misma, de la población celular puede comprender esferoplastos, por ejemplo, del 0 % a aproximadamente el 60 % o cualquier cantidad entre la misma, del 0 % a aproximadamente el 30 % o cualquier cantidad entre la misma, de la población celular puede comprender esferoplastos, o del 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 % o cualquier cantidad entre las mismas, de la población celular puede comprender esferoplastos.

25 Por el término "composición de aflojamiento de la pared celular" se entiende cualquier composición que produzca un aflojamiento de la pared celular, por ejemplo, que modifique la pared celular de tal forma que los componentes dentro de la pared celular se escinden, se escinden parcialmente, se degradan o se degradan parcialmente, o que rompen enlaces intermoleculares no covalentes o covalentes dentro de, o entre, componentes de la pared celular, u otras modificaciones que debilitan la pared celular, alteran la matriz de la pared celular, o una combinación de los

30 mismos. Los ejemplos de composiciones de aflojamiento de la pared celular incluyen sustancias químicas que alteran o hidrolizan componentes de la pared celular, enzimas que alteran o hidrolizan componentes de la pared celular, productos biológicos que alteran o hidrolizan componentes de la pared celular, o cualquier combinación de al menos dos sustancias químicas, biológicas y enzimáticas que alteran o hidrolizan los componentes de la pared celular. Los ejemplos no limitantes de productos químicos incluyen quelantes, por ejemplo, un quelante de catión

35 divalente tal como EDTA o EGTA, donadores de protones, un radical hidroxilo, hidróxido de potasio, ácido indol-3-acético, imidazol y una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de productos biológicos incluyen auxina, expansina, por ejemplo, una o más alfa-expansina o beta-expansina, y una combinación de las mismas. Los ejemplos no limitativos de enzimas incluyen glucanasas, galacturonasas, poligalacturonasas, xilanasas, pectinasas, pectoliasas, pectozimas, pectinesterasas, metiltransferasas, celulasas, glucanasas, endo-1,4-beta-glucanasas,

40 xiloglucano transglucosilhidrolasas, xiloglucano endoglucanasas, xiloglucano endotransglucosilasa, celobiohidrolasas (exocelulasas), glucósido hidrolasas, beta-glucosidasas, celobiosa deshidrogenasas (celulasa oxidativa), fosforilasas de celulosa, hemicelulasas, lipasas, proteasas y una combinación de las mismas. Como se describe en los Ejemplos a continuación (por ejemplo, Ejemplo 1), un ejemplo no limitante de una mezcla enzimática que puede usarse es una pectinasa, MACEROZYME (Yakult Pharmaceuticals) y una composición de celulasa,

45 Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceuticals). En otro ejemplo no limitante (Ejemplo 17; Figura 16), una mezcla enzimática que puede usarse comprende una pectinasa usada sola o en combinación, por ejemplo, Biocatalysts 162L, Biocatalysts 444L, Biocatalysts PDN33. La pectinasa, o composición de pectinasa también puede usarse junto con celulasa, por ejemplo, Multifect CX CG, Multifect CX B (Genencor), o una combinación de los mismos. Si la composición de aflojamiento de la pared celular comprende una mezcla enzimática que puede usarse para

50 preparaciones de protoplastos (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos a continuación: "Extracción de VLP por digestión de la pared celular", Ejemplo 1 y Ejemplo 17; véanse también los documentos PCT/CA2010/001489, o PCT/CA2010/001488), entonces la cantidad de enzima usada, y/o el tiempo de digestión o cualquier otro parámetro de digestión, es menor de lo que se usa típicamente para preparar protoplastos. Por ejemplo, la cantidad de enzima utilizada puede ser del 0,1 aproximadamente el 75 %, o cualquier cantidad entre la misma de la cantidad que

55 normalmente se usaría para preparar protoplastos. Por ejemplo, la cantidad de enzima usada como una composición de aflojamiento de la pared celular producirá una composición de células vegetales que comprende del 0 a aproximadamente el 50 % o cualquier cantidad entre la misma de protoplastos. Como alternativa, la cantidad de enzima utilizada como composición de aflojamiento de la pared celular puede ser similar a la utilizada para preparar protoplastos (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos "Extracción de VLP por digestión de la pared celular", y

el Ejemplo 1; y los documentos PCT/CA2010/001489, o PCT/CA2010/001488), pero la duración de la incubación se reduce de aproximadamente el 30 a aproximadamente el 80 %, o cualquier cantidad entre la misma, de la duración que normalmente se usaría para preparar protoplastos.

5 La composición de aflojamiento de la pared celular, por ejemplo, una solución enzimática o solución de digestión, puede infiltrarse en una planta entera, un órgano de la planta o una hoja entera utilizando, por ejemplo, infiltración al vacío (véase el Ejemplo 17, por ejemplo, usando condiciones similares a las que se describen en D'Aoust et al., 2008 Plant Biotechnology J. 6:930-940; WO 00/063400; WO 00/037663) o infiltración a presión (por ejemplo, usando una presión de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 kPa o cualquier cantidad entre la misma durante 10 aproximadamente 1 minuto a 10 horas). Por planta entera se entiende una planta que comprende raíces, tallo y hojas. Por órgano de una planta se entiende el sistema de raíces, la parte aérea de una planta (tallo con hojas), el tallo con hojas retiradas, la flor, o una o más hojas (con o sin el pecíolo). Por hoja entera (u hojas enteras) se entiende una hoja o una o más hojas (con o sin el pecíolo) que se elimina de la planta pero que de otra forma está intacta ya que no se corta en trozos más pequeños. Como se describe en el presente documento, la infiltración de 15 una composición de aflojamiento de la pared celular dentro de, por ejemplo, una planta completa, o una o más hojas enteras, permite la liberación de proteínas, proteínas de supraestructura o VLP de plantas u hojas enteras. Sin desear quedar ligado a la teoría, cuando una composición de aflojamiento de la pared celular no se infiltra dentro de una hoja entera, existe la necesidad de aumentar los puntos de entrada dentro de la hoja para la composición de manera que la composición enzimática pueda digerir el tejido gradualmente. Por ejemplo, cuando se proporciona 20 una composición de aflojamiento de la pared celular como una solución en la que se empapan las hojas, se produce la digestión enzimática desde los márgenes expuestos hacia la parte interna del tejido de la hoja. Este proceso se mejora usando agitación mecánica que da como resultado la liberación de protoplastos o esferoplastos de la matriz pectocelulósica. La infiltración de una composición de aflojamiento de la pared celular puede requerir una agitación mecánica reducida, tanto en intensidad como en duración, y ayuda a mantener la integridad del protoplasto, y 25 aumenta el rendimiento de los protoplastos. Cuando las enzimas se infiltran dentro de una hoja (u órgano o planta completa) puede llevarse a cabo una agitación continua de la hoja (órgano o planta), pero puede no requerirse agitación.

Al tratar la pared celular con una composición de aflojamiento de la pared celular, las proteínas derivadas de plantas 30 o las supraestructuras de proteínas de interés pueden liberarse más fácilmente. Al utilizar un método que comprende una etapa de aflojamiento de la pared celular, las proteínas derivadas de plantas o las supraestructuras de proteínas de interés pueden enriquecerse, ya que la pared celular y el compartimento protoplásmico que contiene la mayoría de las proteínas de la célula huésped se segregan de las proteínas derivadas de plantas o supraestructuras de proteínas de interés.

35 Por "proteína derivada de plantas", "proteína" o "proteína de interés" (estos términos se usan indistintamente), se entiende una proteína, o subunidad proteica codificada por una secuencia nucleotídica, o región codificante, que se expresará dentro de una planta o parte de la planta, incluyendo proteínas y subunidades de proteínas que son exógenas a la planta o porción de la planta. Las proteínas pueden tener un peso molecular de aproximadamente 1 a 40 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, 45 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 más. 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, 50 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, 55 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

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.

- 5 Las subunidades que se combinan para formar la supraestructura de proteínas pueden ser de un peso molecular 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  
10 estructura cuaternaria que tiene una disposición de múltiples proteínas plegadas o moléculas de proteína en espiral 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  
15 el complejo multiproteico resultante puede tener múltiples funciones catalíticas. El complejo proteico también puede 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  
20 proteasomas (para la degradación de péptidos y proteínas), metabolones (para producción de energía oxidativa), 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-  
25 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, celulasa, xilanas, proteasa, peroxidasa, subtilisina, un suplemento proteico, un  
30 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, 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,  
35 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.

- 40 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  
45 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  
50 aproximadamente 30 a aproximadamente 500 kDa, o cualquier cantidad entre 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  
55 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 µm, 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.

5

Las proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden comprender además uno o más lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, membranas o similares. Dos o más polipéptidos pueden estar conectados por un enlace covalente, un puente disulfuro, interacción de carga, atracción hidrofoba, 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.

20

La presente invención también proporciona un método de recuperación de proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura de una planta o material vegetal, que implica la obtención de una planta o materia vegetal que comprende proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura localizadas dentro del contenido apoplástico; tratar la planta o materia vegetal con una composición de aflojamiento de la pared celular, sonicación o tanto una composición de aflojamiento de la pared celular como sonicación, para producir una planta o material vegetal que tenga una pared celular aflojada, permitiendo, estimulando, aumentando o mejorando de este modo la liberación del contenido apoplástico a través de la pared celular, produciendo así una fracción de contenido apoplástico; filtrar la fracción de contenido apoplástico para producir una fracción filtrada y recuperar las proteínas derivadas de plantas, proteínas o proteínas de supraestructura, de la fracción filtrada. Si se desea, las proteínas derivadas de plantas, proteínas, o proteínas de supraestructura, pueden purificarse a partir de la fracción filtrada. Se pueden usar métodos alternativos conocidos en la técnica para recuperar proteínas o proteínas de supraestructura de la fracción de contenido apoplástico, incluyendo, por ejemplo, centrifugación y decantación.

La presente invención también proporciona un método para recuperar 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 de aflojamiento de la pared celular, sonicación o tanto una composición de aflojamiento de la pared celular como sonicación, para producir una planta o materia vegetal que tiene una pared celular aflojada, permitiendo, estimulando, aumentando o potenciando de este modo la liberación del contenido apoplástico a través de la pared celular, produciendo así una fracción de contenido apoplástico, y separando la proteína de supraestructura de interés que comprende una envoltura lipídica derivada de planta, de la fracción de contenido apoplástico.

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*, de MK Razdan 2ª Ed. (Science Publishers, 2003), o véase, por ejemplo, la siguiente URL: [molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm](http://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). 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 Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1991.

Las enzimas útiles para modificar y aflojar de ese modo la pared celular son conocidas por los expertos en la técnica y pueden incluir celulasa (EC 3.2.1.4), pectinasa (EC 3.2.1.15), xilanasa (EC 3.2.1.8), quitinasas. (EC 3.2.1.14), hemicelulasa, xiloglucano endotransglucosilasa glucanasas, xiloglucano endotransglucosilasa, endoglucanasas tales

- como  $\beta$ -1,3-glucanasa y  $\beta$ -1,4-mananasa, xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasas o una combinación de las mismas. La celulasa es una mezcla de enzimas y puede incluir una o más endo-1,4-beta-glucanasas, celobiohidrolasas (exocelulasas), beta-glucosidasas, celobiosa deshidrogenasas (celulasa oxidativa), celulosa fosforilasas y hemicelulasas. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas que se pueden usar como
- 5 composición de aflojamiento de la pared celular incluyen una mezcla enzimática multicomponente 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).
- 10 Los nombres alternativos y los tipos de celulasas incluyen endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa;  $\beta$ -1,4-glucanasa;  $\beta$ -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)- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasa. Los nombres alternativos y los tipos de pectinasas (poligalacturonasas) incluyen pectina despolimerasa; pectinasa; endopoligalacturonasa;
- 15 pectolasa; pectina hidrolasa; pectina poligalacturonasa; endo-poligalacturonasa; poli- $\alpha$ -1,4-galacturónido glicanohidrolasa; endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa y poli(1,4- $\alpha$ -D-galacturónido) glicanohidrolasa. Los nombres alternativos y los tipos de xilanasas incluyen hemicelulasa, endo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -xilan 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa;  $\beta$ -1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo- $\beta$ -1,4-xilanasa; endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasa; 1,4- $\beta$ -xilan xilanohidrolasa;  $\beta$ -xilanasa;  $\beta$ -1,4-xilan xilanohidrolasa; endo-1,4- $\beta$ -xilanasa;  $\beta$ -D-xilanasa. Los nombres alternativos
- 20 y los tipos de quitinasas incluyen quitodextrinasa; 1,4- $\beta$ -poli-N-acetilglucosaminidasa; poli- $\beta$ -glucosaminidasa;  $\beta$ -1,4-poli-N-acetil glucosaminidasa; poli[1,4-(N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida)] glicanohidrolasa.

**Tabla 1: Ejemplos no limitantes de enzimas disponibles comercialmente para el aflojamiento de la pared celular**

Enzima	Fuente	Proveedor
Celulasas		
Celulasa ONOZUKA R-10	<i>Trichoderma viride</i>	Kinki Yakult Mfg. Col. Ltd. 8-12, Shingkancho 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>Irpexlocteus</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, Múnich
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 sp.</i>	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
Biocatalyst 162L		Biocatalysts
Biocatalyst 444L		Biocatalysts
Biocatalyst PDN33		Biocatalysts

La elección de una enzima particular o combinación de enzimas, y las condiciones de concentración y de reacción pueden depender del tipo de tejido vegetal utilizado a partir del cual se obtiene la fracción celular y aflojada 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. Además, la pectinasa, por ejemplo, pero sin limitación, Biocatalysts 162L y 144L (que comprenden actividad de poligalacturonidasa y pectina liasa), puede usarse sola, o en combinación con otras enzimas, por ejemplo, celulasa, pectinasa, hemicelulasa, o una combinación de las mismas. La pectinasa (que comprende actividad de poligalacturonidasa y pectina liasa) 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 de aflojamiento de pared celular) 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 aflojamiento de la pared celular); 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 etapa del aflojamiento de la pared celular.

Las composiciones químicas y compuestos útiles para modificar y aflojar de este modo la pared celular comprenden, por ejemplo, pero sin limitación, quelantes, quelantes divalentes, radicales hidroxilo, ácido indol-3-acético y expansinas. Los ejemplos de quelantes incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA). Los quelantes pueden estar presentes a una concentración de 0 mM a aproximadamente 500 mM, o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mM o cualquiera cantidad entre las mismas. El uno o más de un quelante se puede combinar con un compuesto químico adicional, una solución enzimática o una combinación de un compuesto químico adicional, una solución enzimática, para proporcionar una composición de aflojamiento de la pared celular. Los ejemplos de expansinas incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, expansina A, expansina B, expansina tipo A, expansina tipo B y expansina tipo X. La expansina puede usarse 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). La una o más de una expansina se puede combinar con una solución enzimática para proporcionar una composición de aflojamiento de la pared celular.

La pared celular puede aflojarse mediante escisión no enzimática de polímeros de pared. Un ejemplo para dicha escisión no enzimática incluye la escisión por radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo pueden producirse mediante la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con, por ejemplo, ascorbato en presencia de una cantidad catalítica de iones de Cu o Fe (reactivo de Fenton). Los métodos y técnicas relacionados con el aflojamiento de la pared celular inducido por radicales hidroxilo se revisan, por ejemplo, en Schopf, Peter (The Plant Journal, 2001, 28(6), 679-688).

Como alternativa, la pared celular podría aflojarse con ácido indol-3-acético (auxina) añadiendo de aproximadamente 0 a aproximadamente 200 μM, o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 μM, o cualquier cantidad entre las mismas. El ácido indol-3-acético se puede combinar con una solución enzimática para proporcionar una composición de aflojamiento de la pared celular.

La pared celular se puede aflojar adicionalmente mediante un tratamiento físico de las células vegetales, tal como sonicación. Una variedad de baños ultrasónicos están disponibles comercialmente y se pueden usar con la presente invención. El término ultrasonido se refiere a frecuencias justo por encima del rango de audición humana, por lo tanto, aproximadamente 20 kHz. Como alternativa, la energía ultrasónica se puede administrar directamente a la solución o suspensión de células a través, por ejemplo, de un transductor. Se puede colocar una solución o suspensión de células, por ejemplo, en un recipiente o pocillo, o en una serie de recipientes o pocillos que comprendan un medio capaz de transmitir energía ultrasónica. Un ejemplo no limitante de un medio es una composición de aflojamiento de la pared celular. El pocillo está unido o está próximo a un transductor adecuado u otro dispositivo capaz de traducir la energía de entrada en energía ultrasónica. Las células pueden colocarse directamente en el pocillo o serie de pocillos que actúan como portamuestras o, como alternativa, las células pueden colocarse en contenedores y sumergirse en el líquido contenido dentro del pocillo. El pocillo puede taparse con un cierre adecuado para evitar fugas o aerosolización. Un rango de frecuencias de sonicación son adecuadas para sonicación de la muestra de planta, puede usarse una energía ultrasónica que varía de aproximadamente 5 KHz a aproximadamente 60 KHz o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 KHz. La sonicación puede proceder de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 10 minutos o en cualquier momento entre el mismo.

Otro parámetro que puede ajustarse para ayudar al aflojamiento de la pared celular es la temperatura. La temperatura puede controlarse durante la etapa de aflojamiento de la pared celular. El intervalo de temperatura útil está 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 del aflojamiento de la pared celular 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<sup>2+</sup>, o Mg<sup>2+</sup>, a 0,5-50 mM, o cualquier cantidad entre las mismas, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, CuSO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, 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.

- 5 La solución de aflojamiento de la pared celular también puede comprender también uno o más de un agente osmótico, por ejemplo, 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<sub>4</sub> de aproximadamente 0 a 75 mM. Sin embargo, como el método descrito en el presente documento afloja la pared celular, en lugar de digerir completamente la pared celular, el uso de un osmótico en la composición de aflojamiento de la pared celular es opcional.

- 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 cortarse en pedazos pequeños (manualmente, o con un dispositivo de trituración o corte, tal como una máquina de cortar Urschel); la materia vegetal cortada puede infiltrarse adicionalmente con una composición química, enzimática, o una mezcla tanto química como enzimática, a un vacío parcial (Nishimura y Beevers 1978, *Plant Physiol* 62:40-43; Newell et al., 1998, *J. Exp Botany* 49:817-827).
- 20 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. Además, las células de plantas cultivadas, ya sean cultivos líquidos o sólidos, se pueden usar para preparar una preparación de planta que comprende paredes celulares aflojadas.

- 25 Puede ser deseable usar una composición enzimática que carezca, o que tenga lipasas o proteasas inactivadas. Por ejemplo, puede incluirse uno o más inhibidores de proteasa, o lipasa en la composición enzimática. Los ejemplos de inhibidores de lipasa incluyen RHC80267 (SigmaAldrich); los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen E-64, Na2EDTA, Pepstatina, aprotinina, PMSF, Pefabloc, Leupeptina, bestatina y similares.

- 30 Se puede usar cualquier método adecuado para mezclar o agitar la materia vegetal en la composición enzimática. Por ejemplo, la materia vegetal puede voltearse o agitarse suavemente en una bandeja o recipiente o a través de un agitador rotatorio, cayendo en un tambor giratorio u oscilante.

- Como un ejemplo no limitante, una composición enzimática que comprende celulasa al 1,5 % (Onozuka R-10) y MACEROZYME™ al 0,375 % en manitol 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y MES 5 mM (pH 5,6) se puede usar como composición de aflojamiento de la pared celular para su uso con tejidos de plantas, por ejemplo, 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 de la información descrita en el presente documento, será capaz de determinar una composición enzimática adecuada para la edad y cepa de la *Nicotiana sp.*, o para otra especie de planta utilizada para la producción de VLP.
- 40 Como otro ejemplo no limitante, una composición enzimática que comprende una o más pectinasas del 1 al 4 % (v/v), o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0 % (v/v) o cualquier cantidad entre las mismas. Por ejemplo, puede usarse del 1 al 4 % o cualquier cantidad entre la misma, de cada uno de Biocatalysts 162L, Biocatalysts 444L, o una combinación de los mismos, en un tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, bisulfito sódico al 0,04 % a pH 6,0 como una composición de aflojamiento de la pared celular para su uso con tejidos de plantas, por ejemplo, tejidos de *Nicotiana*. Además, puede usarse una composición que comprende una o más pectinasas (por ejemplo, Biocatalysts 162L, Biocatalysts 444L, o una combinación de los mismos, cada uno del 1 % al 4 % v/v, o cualquier cantidad entre la misma) junto con una o más celulasas, del 1 % al 4 % (v/v) o cualquier cantidad entre la misma, por ejemplo, Multifect CX CG, Multifect CX B (Genencor), o una combinación de los mismos, en un tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, bisulfito de sodio al 0,04 % a pH 6,0, como una composición de aflojamiento de la pared celular para su uso con tejidos de plantas, por ejemplo, tejidos de *Nicotiana*.

- Por "fracción de contenido apoplásico" se refiere a una fracción que se obtiene después del aflojamiento o aflojamiento parcial de la pared celular, usando una composición de aflojamiento de la pared celular o modificando de otro modo la pared celular para aflojar la pared celular, por ejemplo sonicación, o una combinación de una composición de aflojamiento de la pared celular y sonicación. La fracción de contenido apoplásico puede obtenerse después de la incubación de la planta o material vegetal con una composición de aflojamiento de la pared celular, sonicación, o una combinación de los mismos, para obtener una mezcla de incubación de plantas, y filtración,

centrifugación o una combinación de las mismas, la mezcla de incubación de la planta producir una fracción de contenido apoplásico. La fracción de contenido apoplásico típicamente comprende componentes solubles presentes en el apoplasto. La fracción de contenido apoplásico también puede comprender algunos componentes que surgen de la alteración de la pared celular.

5

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 vegetales, proteínas o proteínas de supraestructura, atrapadas de otra manera dentro de la pared celular. Este protocolo también minimiza la contaminación de las proteínas vegetales, o proteínas de supraestructura, con los componentes intracelulares. Las proteínas vegetales, proteínas o proteínas de supraestructura de interés pueden separarse de los restos celulares después del aflojamiento de la pared celular utilizando 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 de contenido apoplásico que comprende las proteínas vegetales, las proteínas o las proteínas de supraestructura de interés.

10

15

Dado que el método descrito en el presente documento afloja la pared celular, en lugar de digerir completamente la pared celular, puede que no sea necesario un osmótico. Si se usa un osmótico, la fracción celular que comprende orgánulos, protoplastos y pared celular, puede separarse de la fracción de contenido apoplásico usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, filtración en profundidad, sedimentación, precipitación, o una combinación de las mismas, para obtener una fracción de protoplasto aflojada que comprende las proteínas vegetales o proteínas de supraestructura de interés y/o que comprende protoplastos/esferoplastos que comprenden las proteínas o proteínas de supraestructura de interés.

20

25

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 supraestructura, 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.

30

35

Durante la síntesis, las proteínas vegetales, proteínas o proteínas de supraestructura de interés 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  $\mu$ m, o cualquier cantidad entre el mismo. Si la proteína de supraestructura es un anticuerpo, tienen un peso molecular de aproximadamente 100 kDa a aproximadamente 1000 kDa, o cualquier cantidad entre el mismo. 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.

40

45

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 aflojar 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 químicos, métodos enzimáticos, o una combinación de los mismos, descritos en el presente documento. Sin embargo, no se requiere que la integridad de todos los protoplastos se mantenga durante el procedimiento.

50

55

Una proteína de supraestructura, por ejemplo, una VLP producida en una planta puede complejarse con lípidos derivados de plantas. Los lípidos derivados 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, fitoesteroles o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípido vegetal". Los ejemplos de fitoesteroles 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:  
 MAKNVAFGLLFSLLLLVPSQIFAAE; 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), orgánulo 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 nucleotídica 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 aminoácídicas 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.

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 aflojamiento 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 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 galatosilación.

El perfil de N-glucosilación modificado puede obtenerse coexpresando dentro de una planta, una porción de una planta, o una célula vegetal, una secuencia nucleotídica que codifica una primera secuencia nucleotídica 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 nucleotídica operativamente vinculada con una primera región reguladora que está activa en la planta, y una segunda secuencia nucleotídica para codificar la proteína de supraestructura de interés, la segunda secuencia nucleotídica 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.

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.

- 5 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 nucleotídica quimérica". Una partícula pseudovírica comprendida por HA quimérica puede describirse como una "VLP quimérica".
- 10 Las VLP quiméricas se describen adicionalmente en la PCT N.º PCT/CA2010/000983, presentada el 25 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 nativa o quimérica.

La HA de las VLP preparadas de acuerdo con un método proporcionado por la presente invención, incluye 15 secuencias conocidas y secuencias HA variantes que pueden desarrollarse o identificarse. Además, las VLP 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.

- 20 Generalmente, el término "lípidos" se refiere a moléculas liposolubles (lipófilas), de origen natural. Una VLP quimérica producida en una planta, de acuerdo con algunos aspectos de la invención, puede complejarse con lípidos derivados de plantas. Los lípidos derivados 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, donde la VLP se produce, incluyendo, fosfolípidos, tri, di y 25 monoglicéridos, así como un esteroles soluble en grasa o metabolitos que comprenden esteroides. Los ejemplos incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol, fosfatidilserina, glucoesfingolípidos, fitoesteroides, o una combinación de los mismos. Un lípido derivado de plantas puede denominarse, como alternativa, como un "lípidos vegetal". Los ejemplos de fitoesteroides incluyen campesterol, estigmaesterol, ergosterol, brasicesterol, delta-7-estigmaesterol, delta-7-avenaesterol, daunoesterol, sitoesterol, 24-metilcolesterol, colesterol o 30 beta-sitoesterol (Mongrand et al., 2004, J. Biol Chem 279: 36277-86). Como entenderá fácilmente un experto en la 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 plasmáticas comprenden generalmente bicapas lipídicas, así como proteínas para diversas 35 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 salida 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 40 intracelulares y extracelulares.

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 glicoproteína estructural de partículas víricas de influenza. La HA 45 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 50 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 se conocen bien 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](http://biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza)) o las bases de datos mantenidas por el National Center 55 for Biotechnology Information (NCBI; por ejemplo, en la URL: [ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=influenza](http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=influenza)).

La presente divulgación también pertenece a los métodos de preparación, recuperación, aislamiento, o tanto preparación, como recuperación 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 a más de un animal huésped. La variación de aminoácidos se tolera en

5 hemaglutininas de virus de influenza. Esta variación proporciona nuevas cepas que están identificándose 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 recuperar cualquier VLP derivada de plantas, independientemente del subtipo o secuencia de HA, o HA quimérico que comprende la VLP, o especie de origen.

10

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 a, o

15 estar asociados transitoriamente con la proteína plegada, parcialmente plegada o desplegada, la presencia de una o más proteínas chaperonas, 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 la síntesis de proteínas, tráfico intracelular, prevención del

20 plegamiento incorrecto, prevención de agregación de proteínas, ensamblaje y desensamblaje 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. y Lindquist, S. Ann. Rev.

25 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).

30

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

35 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

40 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, Bradford Assay, 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

45 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 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.

50

Si la proteína de supraestructura es una VLP, entonces se puede usar un ensayo de hemaglutinación para evaluar la 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

55 HA equina y aviar de los virus de la influenza aglutina los eritrocitos de las varias especies, incluyendo pavos, pollos, patos, cobayas, seres humanos, ovejas, caballos y vacas; mientras que las AH humanas se unirán a 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 quimérica puede inhibir la aglutinación de glóbulos rojos (RBC) por HA recombinante. Los títulos de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación de muestras séricas pueden evaluarse por HAI de microtítulo (Aymard et al 1973).

- 5 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 apropiada de los sitios antigénicos en las HA.

- 10 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 un HDC de un primer tipo o subtipo de influenza se puede usar en un ensayo de HAI con una segunda cepa de virus entero o partículas de virus, y se determina el título de HAI.

- 15 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 uno o más de un virus de influenza. Los ejemplos de vacunas adecuadas incluyen, pero sin limitación, los comercialmente disponibles en Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, 20 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 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 25 antígenos de malaria, antígenos de VIH, antígenos del virus sincicial respiratorio (RSV) y similares.

- 30 Se establecen en la técnica métodos para la transformación, y regeneración de plantas transgénicas, células 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.

- 35 Por "transformación" se refiere a la transferencia interespecífica de información genética (secuencia nucleotídica) 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.

- 40 Por la expresión "materia vegetal", se refiere a cualquier material derivado de una planta. La materia vegetal puede comprender una planta completa, tejido, células, o cualquier fracción de los mismos. 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 puede comprender plantas, células vegetales, 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 45 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.

- 50 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 y Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. En *Plant Metabolism*, 2ª Ed. DT. 55 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 y 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.

5

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.

- 10 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 Agro-inoculación o Agro-infiltración, una mezcla de *Agrobacteria* que comprende el ácido nucleico deseado, entra en los espacios intercelulares de un tejido, por ejemplo, las hojas, la parte aérea de la planta (incluido el tallo, las hojas y la flor), otra porción de la planta (tallo, raíz, flor), o toda la planta. Después de cruzar la epidermis, *Agrobacterium*
- 15 infecta y transfiere copias de t-ADN 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	<b>pBinPlus.2613c:</b> AGGAAGGGAAGAAAAGCGAAAGGAG	
4	<b>Mut-ATG115.r:</b> GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGT TGAAGATCGCTCACGCAAGAAAAGACAAGAGA	
5	<b>Mut-ATG161.c:</b>	
	GTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAA CGTTTTCTTCACTGAAGCGA	
6	<b>LC-C5-1.110r:</b> TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG	
7	<b>Apal-H5 (A-Indo).1c:</b>	
	TGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGC TTCTTCTTGCAAT	
8	<b>H5 (A-Indo)-Stul.1707r:</b> AAATAGGCCTTTAAATGCAAATTC TGCATTGTAACGA	
9	Secuencia de ácido nucleico (construcción 660)	5
10	Péptido señal PDI: MAKNVAIFFLLFSLLLLVPQIFAE	
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

### Ejemplos

#### Ensamblaje de casetes de expresión

- 10 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. 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- <i>HT</i>	H1/Cal WT
580	SpPDI-H1 A/New Caledonia/20/99 en el casete de expresión de 2x35S/CPMV- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	H1/Indo
686	SpPDI-H5 A/Indonesia/5/2005 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	H1/Bris
733	SpPDI-H1 A/Brisbane/59/2007 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	H1/Bris
735	H3 A/Brisbane/10/2007 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	H3/Bris

736	SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	Quimera H3/Bris-H5/Indo
738	HA B/Florida/4/2006 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	B/Flo
739	SpPDI-HA B/Florida/4/2006 en el casete de expresión de CPMV- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	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- <i>HT</i>	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 ApaI 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).

### 15 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 limitado a, 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:  
 40 GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC (SEQ ID NO:11)

y supP19-plasto.r  
 CCTTGATAGCTCGTTCCATTTTCTCTCAAGATG (SEQ ID NO:12)

45 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)

50 y SupP19-Sacl.r  
 AGTCGAGCTCTTACTCGCTTTCTTTTCGAAG (SEQ ID NO:14)

usando la construcción 35S:p19 como se describe en Voinnet et al. (*The Plant Journal* 33: 949-956 (2003)) como 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, 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 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

10

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 bajo las mismas condiciones ambientales. Después de seis semanas, las plantas tenían un peso medio de 80 g y 30 cm de altura.

15

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 DO<sub>600</sub> 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 (MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MES 10 mM pH 5,6).

20

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.

25

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

30

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.

35

#### 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 cm<sup>2</sup>. 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, CaCl<sub>2</sub> 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.

40

45

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 cm<sup>2</sup>. Se añadieron Pectinasa FE

Multifect, 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.

- 5 Después de la incubación, se eliminaron los residuos de hoja por filtración (filtro de nylon de malla de 250 o 400  $\mu$ m). 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

- 15 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  $\mu$ l) en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100  $\mu$ l de PBS, dejando 100  $\mu$ l 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 20 recombinante (A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT) en PBS y funcionó como un control en cada placa.

### ELISA

- 25 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  $\mu$ g/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 30 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, 35 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  $A_{450}$  se midieron usando un lector de placas 40 Multiskan Ascent (Thermo Scientific).

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

- 45 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 50 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  $\mu$ m). Los protoplastos en suspensión se separaron por centrifugación a 200xg (15 min), y el 55 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.

**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.**

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 cm<sup>2</sup>, después se digirieron, se filtraron por grueso y se centrifugaron como se describe en el Ejemplo 1.

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.

### **30 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 HAO 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 cm<sup>2</sup>, 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 de contenido apoplásico), 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 cm<sup>2</sup> 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 de contenido apoplásico 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 (Sartopore GF plus/Sartorius Stedim) y un filtro de 0,45/0,2 µm (Sartopore 2/Sartorius Stedim), antes de someterse a cromatografía.

La fracción de contenido apoplásico clarificada se cargó sobre una columna de intercambio catiónico (Poros HS Applied Biosystems) equilibrada con un tampón de equilibrado/elución (NaPO<sub>4</sub> 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.

- 5 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. La recuperación de la HA-VLP, basada en la actividad de hemaglutinación de HA, fue del 92 % tras la columna de intercambio catiónico.
- 10 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 cm<sup>2</sup> y se digieren 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.

20 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.

25 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 rendimiento de recuperación de H5 no se aumentó significativamente con este enfoque (Tabla 4).

30 **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) <sup>1</sup>
H5 Indo/05 (#972)	∅ NaCl	4608	12.430	1,2
	NaCl 500 mM	4608	14.921	
H1 CA/07 WT (#604)	∅ NaCl	384	1.206	2,1
	NaCl 500 mM	768	2.481	
H1 CA/07 X-179A (#605)	∅ NaCl	96	299	8,1
	NaCl 500 mM	768	2.419	
B Flo/4 (475)	∅ NaCl	16	52	7,5
	NaCl 500 mM	128	392	

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

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 <sup>1</sup>	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 %	

<sup>1</sup>La 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 cm<sup>2</sup>, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> en la pared celular de la planta, la adición de EDTA de Ca<sup>2+</sup>-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<sub>672 nm</sub> - OD<sub>650 nm</sub>). Cuando los constituyentes verdes se liberaron en gran cantidad, o no se eliminaron adecuadamente, la preparación de VLP mostró un ΔOD >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 <sub>672nm</sub> - OD <sub>650nm</sub>
NaCl 0 mM, EDTA 0 mM	<b>0,071 ± 0,061</b>
NaCl 500 mM	<b>0,087 ± 0,060</b>

NaCl 500 mM + EDTA 25 mM	<b>0,010 ± 0,002</b>
--------------------------	----------------------

### 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 cm<sup>2</sup> 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.

10

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).

15

**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)

25

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 5 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 agrofiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción 10 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 cm<sup>2</sup> 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 NaPO<sub>4</sub> 75 mM; con el pH del 15 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 20 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 <sup>1</sup>	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 <sub>4</sub> 75 mM + NaCl 500 mM + EDTA 25 mM pH 6,5	4	2,19	5,9

<sup>1</sup>Todos 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 25 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 <sup>1</sup>	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

<sup>1</sup>Todos los tampones de digestión contenían manitol 600 mM, metabisulfito sódico al 0,04 %, citrato 125 mM + NaPO<sub>4</sub> 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 PO<sub>4</sub>. 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.

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

Composición de tampón <sup>1</sup>					Concentración de VLP B (dil/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	pH posterior a la digestión
Manitol (mM)	Citrato (mM)	PO <sub>4</sub> (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

<sup>1</sup>Todos 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)

15 **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

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

<sup>1</sup>Todos los tampones contenían Citrato 125 mM, NaPO<sub>4</sub> 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-5 VLP obtenido (Tabla 14).

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

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

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

<sup>2</sup>Se 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.

## 10 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.

**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

20

## Ejemplo 10: Preparación, expresión y análisis de anticuerpos

### Ensamblaje del casete de expresión C2B8 (construcción n.º 595)

25 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).

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 DraIII (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 DraIII 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 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 flanqueado por un sitio de restricción DraIII (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 DraIII 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".

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 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)**

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**

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.

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 OD<sub>600</sub> > 2,0. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes del uso y volvieron a suspender en medio de infiltración (MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se 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.

#### **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 NaPO<sub>4</sub> 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.

**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 cm<sup>2</sup>. Los trozos de hoja se colocaron en 2,425 volúmenes de solución de digestión (citrato 75 mM, pH 6,9, manitol 600 mM, Pectinasa 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.

10

**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.

15

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.

20

**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).

25

**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.

**50 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 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M/CH<sub>3</sub>CN (1/1) durante 15 minutos cada vez y se secaron.

55

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 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, a 56 °C durante 45 minutos. La alquilación se realizó añadiendo 600 µl de una solución de yodoacetamida 55 mM en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los

sobrenadantes se descartaron y los fragmentos de poliacrilamida se lavaron una vez más en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M/CH<sub>3</sub>CN (1/1).

Las proteínas se digirieron luego con 7,5 µg de tripsina (Promega) en 600 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,05 M, a 37 °C durante 5 16 h. Se añadieron doscientos µl de CH<sub>3</sub>CN y se recogió el sobrenadante. Los fragmentos de gel se lavaron entonces con 200 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M, luego con 200 µl de CH<sub>3</sub>CN 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 10 glucopéptidos se eluyeron específicamente con CH<sub>3</sub>CN al 10 % en agua y luego se analizaron mediante MALDI-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.

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

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 20 realizaron dos veces y los extractos resultantes se compararon para determinar el volumen, la concentración de 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

25 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 30 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).

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

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 40 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-glicosilación)

La N-glicosilación 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 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 postraduccional de proteínas terapéuticas en plantas (Curr. Opin. Plant Biol. 2004, 7: 171-181). Las enzimas de la ruta de N-glicosilación se colocan en lugares precisos en cada compartimento de la ruta de secreción, 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-glicosilación 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 (Vezina et al., Plant Biotechnol. J. 2009 7: 442-455). Se informó una observación 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 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 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-glicosilación en anticuerpos C2B8 purificados como se describe en el 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 y una o más enzimas para modificar el perfil de N-glicosilación 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-glicosilación puede implicar la coexpresión de la proteína de interés junto con una secuencia nucleotídica 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 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 nucleotídica que codifica N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III, SEQ ID NO: 16 como se describe en el 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.

#### **Ejemplo 15: Tratamiento de biomasa vegetal para aflojar la pared celular de la planta**

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (H1/CA07) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 5 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm<sup>2</sup> y se digirieron de acuerdo con el Ejemplo 4, y usando un tampón de citrato 75 mM, NaCl 500 mM, a pH 6,1 con modificaciones para incluir EDTA 0, 25, 100 o 250

mM. La filtración gruesa y la centrifugación de los restos celulares fueron como se describe en el Ejemplo 4. El sobrenadante de esta centrifugación se ensayó para determinar la concentración de proteína y la actividad de hemaglutinación. Las plantas se trataron con o sin las enzimas de digestión descritas en el Ejemplo 4 para ilustrar el efecto de EDTA sobre la liberación de proteína. Vale la pena observar que las enzimas añadidas al tampón de digestión representan aproximadamente 0,8 mg/ml. La Figura 15 muestra que la adición de EDTA a la planta, sin las enzimas, puede extraer proteínas del apoplasto, que contiene las VLP H1.

La Figura 15 también muestra que EDTA tiene un efecto potenciador de liberación de VLP H1, con un efecto máximo entre 20-100 mM. Se cree que el EDTA actúa como un eliminador de Ca<sup>++</sup>, que es un constituyente importante de la pared celular de la planta, para facilitar la despolimerización de la pared celular de la planta.

#### Ejemplo 16: Tratamiento de biomasa vegetal para aflojar la pared celular de la planta

Las plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con cepas *Agrobacterium* AGL1 que portaban una construcción que expresaba una hemaglutinina de interés (H1/CA07) como se describe en el Ejemplo 1. Las hojas se recogieron el día 5 después de la infiltración, se cortaron en trozos de ~1 cm<sup>2</sup> y se digirieron de acuerdo con el Ejemplo 4. El tampón de digestión de control contenía Pectinasa Multifect FE, al 1,0 % (v/v), Multifect CX CG al 1,0 % (v/v) y/o Multifect CX B al 1,0 % (v/v) (todos de Genencor), cada uno en una solución de tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, EDTA 25 mM, bisulfito de sodio al 0,04 % a pH 6,0 utilizando una relación biomasa:tampón de digestión de 1:2,5 (p/v). Se realizó una digestión comparativa que contenía un 3 % de Pectinasa Multifect FE, (v/v) en el mismo tampón de digestión. La filtración gruesa y la centrifugación de los restos celulares fueron como se describe en el Ejemplo 4. El sobrenadante de esta centrifugación se ensayó para determinar la concentración de proteína y la actividad de hemaglutinación. La Tabla 17 muestra que el componente de pectinasa permite la liberación de proteínas y VLP de HA.

La Tabla 17 muestra la liberación de proteínas y VLP tras el tratamiento en planta con un pectinasa al 3 %, con o sin el uso de enzimas específicas de celulosa y hemicelulosa. La concentración de proteínas se midió usando el ensayo de Bradford. La actividad de HA se expresa como la inversa de la menor cantidad de proteína extraíble para glóbulos rojos hemaglutinantes.

Tabla 17

Tratamiento	Concentración de proteínas (mg/ml)	HA/mg
Digestión de control usando un 1 % de cada celulasa CXG y CB + 1 % de pectinasa FE al 1 %	1,44	18474
Digestión usando el 3 % de pectinasa al 3 %	1,27	18474

#### Ejemplo 17 Tratamiento de hojas y plantas mediante infiltración enzimática

La infiltración enzimática puede permitir una liberación aumentada de VLP a partir de hojas enteras. Para examinar este enfoque, las VLP se extrajeron de las hojas que se infiltraron con una composición de aflojamiento de la pared celular, ya sea al vacío o bajo presión.

#### Extracción de VLP

Las plantas se agroinfiltraron con AGL1/# 685 como se describe en el ejemplo 1. El tejido foliar se recogió de las plantas de *N. benthamiana* en día 5 o 7 después de la infiltración. Las plantas enteras y/o hojas enteras se empaparon o se sometieron a infiltración (usando condiciones similares descritas anteriormente para la agroinfiltración, véase "Preparación de biomasa vegetal, inóculo, agroinfiltración y cosecha") en una solución enzimática que comprende: una o más pectinasas: (Biocatalyst 162L del 1 % al 4 % (v/v), Biocatalysts 444L de 1,0 % al 4,0 % (v/v), o una combinación de los mismos, cada uno del 1 % al 4 % (v/v), Biocatalysts PDN33 del 1 % al 4 % (v/v) en un tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, bisulfito sódico al 0,04 % a pH 6,0 usando una relación de 1:2,5 (p/v) de biomasa fresca:tampón de digestión. Las plantas enteras o las hojas enteras también se empaparon o se infiltraron en una solución enzimática que comprendía pectinasa (Biocatalyst 162L del 1 % al 4 % (v/v) y Biocatalysts 444L del 1,0 % al 4,0 % (v/v)) y celulasa (Multifect CX CG y/o Multifect CX B (Genencor), del 1,0 % al 4,0 % de cada uno (v/v)), en un tampón de manitol 600 mM, citrato 75 mM, bisulfito sódico al 0,04 % a pH 6,0

utilizando una relación de 1:2,5 (p/v) de biomasa fresca:tampón de digestión. En un ejemplo, se añadió Biocatalyst 162L al 1 % y se añadió Biocatalyst 44L al 4 % de 444L, sin embargo, un experto en la técnica entenderá que estos porcentajes pueden variar dependiendo del periodo de digestión. Cuanto mayor es la actividad de pectinasa, más corto es el periodo de digestión. Un experto en la técnica apreciará además que se puede usar una amplia gama de enzimas conocidas en la técnica siempre que se cumplan los requisitos pectolíticos de este procedimiento. El tampón puede ajustarse a un pH de 5,0 a 6,5 o cualquier cantidad entre la misma, y dejarse tal cual durante la duración de la digestión, o el pH se puede ajustar para permanecer en el valor inicial (es decir, en un intervalo de 5,0 a 6,5 o cualquier cantidad entre la misma) mediante la adición de soluciones tamponantes. Además, el tampón se puede complementar opcionalmente con diversos antioxidantes, tal como, por ejemplo, metabisulfito. Las enzimas de la solución enzimática se infiltran en plantas enteras o en hojas enteras mediante vacío o infiltración a presión.

Después de la infiltración enzimática, las hojas y/o plantas completas pueden dejarse en el tampón de digestión y agitarse al final del procedimiento, o agitarse lentamente (entre 40-80 rpm dependiendo del tipo de recipiente) durante todo el periodo de digestión. Las diferentes agitaciones conducirán a diferentes niveles de digestión, especialmente para el tejido vascular (venas de la hoja). Las hojas que no están infiltradas con la enzima tardarán más (es decir, el procedimiento de 15 horas como se describe en el Ejemplo 4) y se requiere una agitación más fuerte.

La Figura 16A muestra que se liberan tantas VLP (liberación de HA en solución) en 4 horas (Tiempo 0,25 t) de hojas que se han infiltrado con una solución enzimática, como después de 16 horas (Tiempo t), cuando las hojas se empapan solamente y se agitan en la misma solución enzimática. También se observa (resultados no mostrados) que las infiltraciones repetidas son más beneficiosas que una etapa de infiltración única prolongada. La infiltración de enzimas permite que se libere la misma cantidad de HA/VLP en un cuarto del tiempo de digestión, en comparación con las hojas que se empapan y se agitan, pero no se infiltran con la misma solución enzimática.

Se observó también que la infiltración enzimática era más eficaz con las hojas enteras que con las hojas cortadas (véase la Figura 16B) cuando se determinó la liberación de HA. La infiltración enzimática permite un proceso de extracción más sencillo, ya que se pueden usar hojas o plantas completas y, por lo tanto, se puede omitir la etapa cortar la planta o el material vegetal.

La licuefacción del tejido foliar se puede obtener mediante el uso de pectinasa solamente, con liberación eficiente de HA/VLP. La infiltración enzimática de las pectinasas también funciona mejor solo con las pectinasas, especialmente las enzimas que tienen un alto contenido relativo de poligalacturonasa (por ejemplo, Biocatalyst 162L/144L) en comparación con Biocatalyst 444L solamente. (Figura 16C). Se pueden usar cualesquiera pectinasas, en solitario o en combinación entre sí, siempre que tengan actividad de poligalacturonidasa o actividad de pectina liasa, o ambas. Las pectinasas adecuadas son, por ejemplo, "Biocatalyst 162L" y/o "Biocatalyst 144L". La infiltración enzimática permite el uso de una solución de digestión más sencilla, por ejemplo, una solución que comprende solo pectinasa. Sin desear quedar ligado por la teoría, esta solución puede ser menos perjudicial para el protoplasto.

Como se observa en la Figura 16D, con tampones y mezclas enzimáticas apropiadas, la extracción asistida por enzimas de HA/VLP puede tener lugar a un pH cercano a la neutralidad. Por lo tanto, el uso de la infiltración enzimática permite la purificación de proteínas sensibles al pH.

La mención de las referencias en el presente documento no debe interpretarse ni considerarse como una admisión de que tales referencias son la técnica anterior de la presente invención.

Se han descrito una o más realizaciones actualmente preferidas de la invención a modo de ejemplo. La invención incluye todas las realizaciones, modificaciones y variaciones sustancialmente como se ha descrito anteriormente en el presente documento y con referencia a los ejemplos y figuras. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar una serie de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos por cualquier aspecto de la invención con el fin de lograr el mismo resultado sustancialmente de la misma manera.

## 55 LISTA DE SECUENCIAS

<110> MEDICAGO INC.  
Couture, Manon  
Paquet, Dany

VEZINA, Louis-Philippe

<120> MÉTODO PARA RECUPERAR PROTEÍNAS DERIVADAS DE PLANTAS

5 <130> V83963WO

<150> US 61/466.889

<151> 23-03-2011

10 <160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 3067

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción 685 para expresar H5/Indo

<400> 1

```

ttaat taaga attcgagctc caccgcgaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct      60
gtcactttat tgagaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg      120
ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggtoceaaa gatggacccc      180
caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg      240
attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag      300
acccttctc tatataagga agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt      360
tttgataaaa gcgaacgtgg ggaaaccgga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc      420
tctcttaaag caaacttctc tcttgtcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga      480
tcgtgcttcg gcaccagtac aacgttttct ttactgaag cgaatcaaa gatctctttg      540
tggacacgta gtgcggcgcc attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt      600
cttgggaaaa gaaagcttgc tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat      660
tctgctgact ttccggcggg gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgctg      720
tacttctttc ttcttcttct tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa      780
acagagtttt cccgtggttt tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg      840
cccaaatttg tcgggcccat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt cagtcttggt      900
aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat gcaaacaatt caacagagca ggttgacaca      960
atcatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac     1020
gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt taagagattg tagttagtct     1080
    
```

ES 2 682 066 T3

ggatggctcc tcggaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtaccgga atggtcttac 1140  
 atagtggaga aggccaatcc aaccaatgac ctctgttacc caggagttt caacgactat 1200  
 gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca aatcatcccc 1260  
 aaaagttcct ggtccgatca tgaagcctca tcaggagtta gctcagcatg tccatacctg 1320  
 ggaagtccct ctttttttag aatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacataccca 1380  
 acaataaaga aaagctaca taataccaac caagaggatc ttttggact gtggggaatt 1440  
 caccatccta atgatgcggc agagcagaca aggctatc aaaacccaac cacctatatt 1500  
 tccattggga catcaacact aaaccagaga ttggtacca aatagctac tagatccaaa 1560  
 gtaaacgggc aaagtggaag gatggagttc ttctggaca ttttaaacc taatgatgca 1620  
 atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcataca aattgtcaag 1680  
 aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgca caccaagtgt 1740  
 caaactcca tggggcgat aaactctagt atgccattcc acaacataca ccctctcacc 1800  
 atcggggaat gcccaataa tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac agggctcaga 1860  
 aatagccctc aaagagagag cagaagaaaa aagagaggac tatttggagc tatagcaggt 1920  
 tttatagagg gaggatggca gggaatggta gatggttgg atgggtacca ccatagcaat 1980  
 gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc 2040  
 accaataag tcaactcaat cattgacaaa atgaacactc agtttgaggc cgttggaagg 2100  
 gaatttaata acttagaaag gagaatagag aatttaaca agaagatgga agacgggttt 2160  
 ctagatgtct ggactataa tgccgaactt ctggttctca tggaaaatga gagaactcta 2220  
 gactttcatg actcaaatgt taagaacctc tacgacaagg tccgactaca gcttagggat 2280  
 aatgcaaagg agctgggtaa cggttgtttc gagttctatc acaaatgtga taatgaatgt 2340  
 atgaaaagta taagaaacgg aacgtacaac tatccgcagt attcagaaga agcaagatta 2400  
 aaaagagagg aaataagtgg ggtaaaattg gaatcaatag gaacttacca aatactgtca 2460  
 atttattcaa cagtggcgag ttccttagca ctggcaatca tgatggctgg tctatcttta 2520  
 tggatgtgct ccaatggatc gttacaatgc agaatttgca ttaaaggcc tattttcttt 2580  
 agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgat ttctatgttt ggtgagcggg tttctgtgct 2640  
 cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tcttttgag ctctgttta gcaggtcgtc 2700  
 ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat ttattaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg 2760  
 gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct 2820  
 taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataattctg ttgaattacg 2880  
 ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gttttatga 2940  
 ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcaact 3000  
 aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga ttctagagtc tcaagcttcg 3060  
 gcgcgcc 3067

ES 2 682 066 T3

<210> 2  
 <211> 568  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos codificada por la construcción 685 para expresar H5/Indo  
  
 10 <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

ES 2 682 066 T3

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  
 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



ES 2 682 066 T3

<223> Cebador Mut-ATG161.c

<400> 5  
gtgtcagat cgtgctcgg caccagtaca acgtttctt tcaactgaagc ga 52

5

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

10

<220>  
<223> Cebador LC-C5-1.110r

<400> 6  
tctcctggag tcacagacag ggtgg 25

15

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

20

<220>  
<223> Cebador LC-C5-1.110r

<400> 7  
tgtcgggcc atggagaaa tagtgcttct tcttgaat 39

25

<210> 8  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Cebador H5 (A-Indo)-Stul.1707r

35

<400> 8  
aaataggcct taaatgcaa attctgcatt gtaacga 37

40

<210> 9  
<211> 3111  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de ácido nucleico (construcción 660)

45

<400> 9  
agaggtaccc cgggctggta tatttatatg ttgtcaaata actcaaaaac cataaaagtt 60  
taagttagca agtgtgtaca tttttacttg aacaaaaata ttcacctact actgttataa 120  
atcattatta aacattagag taaagaaata tggatgataa gaacaagagt agtgateat 180  
tgacaacaat tttgttgcaa catttgagaa aattttgttg ttctctcttt tcattggtca 240  
aaaacaatag agagagaaaa aggaagaggg agaataaaaa cataatgtga gtatgagaga 300

ES 2 682 066 T3

gaaagttgta caaaagttgt accaaaatag ttgtacaaat atcattgagg aatttgacaa 360  
 aagctacaca aataaggggt aattgctgta aataaataag gatgacgcat tagagagatg 420  
 taccattaga gaatttttgg caagtcatta aaaagaaga ataaattatt tttaaaatta 480  
 aaagttgagt catttgatta aacatgtgat tatttaatga attgatgaaa gagttgatt 540  
 aaagttgtag tagtaattag aatttggtgt caaatttaat ttgacatttg atcttttctt 600  
 atatattgcc ccatagagtc agttaactca tttttatatt tcatagatca aataagagaa 660  
 ataacggtag attaatccct ccaaaaaaaaa aaaacggtag atttactaaa aaatctaagc 720  
 cacgtaggag gataacagga tccccgtagg aggataacat ccaatccaac caatcacaac 780  
 aatcctgatg agataaccca ctttaagccc acgcatctgt ggcacatcta 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 tgcaaacaaat 1080  
 tcaacagagc aggttgacac aatcatggaa aagaacgta ctggttacaca tgcccaagac 1140  
 atactggaaa agacacacaa cgggaagctc tgcgatctag atggagtgaa gcctctaatt 1200  
 ttaagagatt gtagttagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc 1260  
 aatgtaccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac 1320  
 ccagggagtt tcaacgacta tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt 1380  
 gagaaaattc aatcatccc caaaagttct tgggtccgatc atgaagcctc atcaggagtt 1440  
 agctcagcat gtccatacct gggaaagtcct tctttttta gaaatgtggt atggcttacc 1500  
 aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaggat 1560  
 cttttggtac tgtggggaat tcaccatcct aatgatgagg cagagcagac aaggctatat 1620  
 caaaacccaa ccacatatat ttccattggg acatcaacac taaaccagag attggtacca 1680  
 aaaatagcta ctagatccaa agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca 1740  
 attttaaac ctaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa 1800  
 tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat 1860  
 ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca atgggggga taaactctag tatgccattc 1920  
 cacacatac accctctcac catcggggaa tgccccaaat atgtgaaatc aaacagatta 1980  
 gtccttgcaa cagggtcag aatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga 2040  
 ctatttgag ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttg 2100  
 tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact 2160  
 caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact 2220

ES 2 682 066 T3

cagtttgagg ccgttggaag ggaatttaat aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac 2280  
 aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc 2340  
 atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag 2400  
 gtccgactac agcttaggga taatgcaaag gagctgggta acggttgttt cgagttctat 2460  
 cacaaatgtg ataatgaatg tatggaaagt ataagaaacg gaacgtacaa ctatccgcag 2520  
 tattcagaag aagcaagatt aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata 2580  
 ggaacttacc aaatactgtc aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc 2640  
 atgatggctg gtctatcttt atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc 2700  
 atttaagagc tctaagtaa aatgcttctt cgtctcctat ttataaatg gtttgttatt 2760  
 gttaattttg ttctttaga agagcttaat taatcgtgtg tgttatgaaa tactatttgt 2820  
 atgagatgaa ctggtgtaat gtaattcatt tacataagtg gagtcagaat cagaatgttt 2880  
 cctccataac taactagaca tgaagacctg cgcgtacaa ttgtcttata tttgaacaac 2940  
 taaaattgaa catcttttgc cacaacttta taagtggta atatagctca aatatatggt 3000  
 caagttcaat agattaataa tggaaatc agttatcgaa attcattaac aatcaactta 3060  
 acgttattaa ctactaattt tataatcatcc cctttgataa atgatagtac a 3111

5 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido señal PDI

<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

15 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador Plasto-443c

<400> 11  
 gtattagtaa ttagaattg gtgtc 25

25 <210> 12  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 682 066 T3

<223> Cebador supP19-plasto.r

<400> 12  
 5 cctgtatag ctcgtccat ttctctcaa gatg 34

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

10 <220>  
 <223> Cebador supP19-1c

<400> 13  
 15 atggaacgag ctatacaagg 20

<210> 14  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador SupP19-Sacl.r

25 <400> 14  
 agtcgagctc ttactcgctt tcttttcga ag 32

<210> 15  
 <211> 1214  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción 590

35 <400> 15  
 cactttgtga gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta 60  
 attaattaat catcttgaga gaaaatggat tttcaggtgc agattatcag cttcctgcta 120  
 atcagtgctt cagtcataat gtccagagga caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc 180  
 ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt 240  
 tacatccact ggttccagca gaagccagga tcctccccc aaccctggat ttatgccaca 300  
 tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc ttcagtgga gtgggtctgg gacttcttac 360  
 tctctcacia tcagcagagt ggaggtgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtg 420  
 actagtaacc caccacggt cggagggggg accaagctgg aatcaaacg tacggtggct 480  
 gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 540  
 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 600

ES 2 682 066 T3

aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 660  
 acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 720  
 tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 780  
 ggagagtgtt gagacgtcgt taaaatgctt cttcgtctcc tatttataat atggtttggt 840  
 attgttaatt ttgttcttgt agaagagctt aattaatcgt tgttgttatg aaatactatt 900  
 tgtatgagat gaactggtgt aatgtaattc atttacataa gtggagtcag aatcagaatg 960  
 tttcctccat aactaactag acatgaagac ctgccgcgta caattgtcct atatttgaac 1020  
 aactaaaatt gaacatcttt tgccacaact ttataagtgg ttaatatagc tcaaatatat 1080  
 ggtcaagtcc aatagattaa taatggaaat atcagttatc gaaattcatt aacaatcaac 1140  
 ttaacgttat taactactaa ttttatatca tccccttga taaatgatag tacaccaatt 1200  
 aggaaggaga attc 1214

<210> 16  
 <211> 1919  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción N.º 592

10

<400> 16  
 cactttgtga gtctacactt tgattocctt caaacacata caaagagaag agactaatta 60  
 attaattaat catcttgaga gaaaatgggt tggagcctca tcttgctcct ccttgtcgct 120  
 gttgctacgc gtgtcctgtc ccaggtacaa ctgcagcagc ctggggctga gctggtgaag 180  
 cctggggcct cagtgaagat gtctgcaag gcttctgggt acacatttac cagttacaat 240  
 atgcaactggg taaaacagac acctggtcgg ggcctggaat ggattggagc tatttatccc 300  
 ggaaatggtg atacttccta caatcagaag ttcaaaggca aggccacatt gactgcagac 360  
 aatcctcca gcacagccta catgcagctc agcagcctga catctgagga ctctgcggtc 420  
 tattactgtg caagatcgac ttactacggc ggtgactggt acttcaatgt ctggggcgca 480  
 gggaccacgg tcaccgtctc tgcagctagc accaagggcc catcgggtcct ccccctggca 540  
 ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 600  
 ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc 660  
 ttccccgctg tctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 720  
 tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 780  
 aaggtggaca agaaagtga gcccaaatct tgtgacaaa ctcacacatg cccaccgtgc 840  
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 900

ES 2 682 066 T3

accctcatga tctccccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccaagaa	960
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1020
aagccgoggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1080
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca	1140
gccccatcg agaaaacccat ctccaaagcc aaagggcagc ctagggaacc acaagtgtac	1200
actctccac catctagga tgagcttact aagaaccaag tttctcttac ttgtcttgtg	1260
aagggattht atccatctga catcgccgtg gaatgggaat ccaacggaca accagagaac	1320
aattacaaga ctactccacc agttcttgat tctgatggat ccttctttct ttattccaag	1380
cttactgttg ataagtccag atggcagcaa ggaaatgtgt tctcttgttc tgttatgcac	1440
gaagctcttc ataatcatta tactcaaaag tccctttctc tttctcctgg aaagtgagac	1500
gtcgttaaaa tgcttctctg tctcctatth ataatatggt ttgttattgt taatthtgtt	1560
cttgtagaag agcttaatta atcgttgttg ttatgaaata ctatthgtat gagatgaact	1620
ggtgtaatgt aattcattta cataagtgga gtcagaatca gaatgthtcc tccataacta	1680
actagacatg aagacctgcc gcgtacaatt gtcttatatt tgaacaacta aaattgaaca	1740
tctthtgcca caactthata agtggthaat atagctcaaa tatatggtca agthcaatag	1800
attaataatg gaaatatcag ttatcgaaat tcattaacaa tcaacttaac gthattaact	1860
actaatthta tatcatcccc thtgataaat gatagtacac caattaggaa ggagaatthc	1919

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de recuperación de partículas pseudovíricas (VLP) o supraestructuras de proteínas de una planta o materia vegetal, que comprende:
- 5 a. obtener la planta o materia vegetal que comprende VLP localizadas en apoplasto o supraestructuras de proteínas localizadas en apoplasto, teniendo las supraestructuras de proteínas localizadas en apoplasto un peso molecular de 75 a 1500 kDa;
- 10 b. tratar la planta o materia vegetal con una composición que comprende EDTA o EGTA de 20 a 250 mM, para aflojar la pared celular para producir una planta o materia vegetal que tenga una pared celular aflojada para obtener una mezcla de incubación de planta, y separar la mezcla de incubación de planta para producir una fracción de células vegetales y una fracción apoplásica; y
- c. recuperar las VLP o las supraestructuras de proteínas de la fracción apoplásica.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que:
- i) el tratamiento de la planta o materia vegetal (etapa b) comprende además sonicación; y/o
- ii) se repite el tratamiento de la planta o materia vegetal (etapa b).
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que:
- i) la composición comprende una o más enzimas; y/o
- ii) la composición comprende EDTA.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que la una o más enzimas se introducen en la planta o materia vegetal mediante infiltración enzimática para producir la planta o materia vegetal que tiene una pared celular aflojada.
5. El método de la reivindicación 4, en el que:
- 30 i) la infiltración enzimática se selecciona del grupo de infiltración de vacío o presión, y/o
- ii) la infiltración enzimática se realiza entre un pH de 5 a un pH de 6,5, y/o
- iii) la infiltración enzimática comprende la infiltración con una o más de una pectinasa, una o más de una celulasa, o una o más de una pectinasa y una o más de una celulasa,
- 35 o
- iv) en donde la infiltración enzimática no incluye la infiltración con una o más de una lipasa, una proteasa o una pectinasa.
6. El método de la reivindicación 1, en el que en la etapa de obtención (etapa a), la planta se transforma con un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína VLP o proteína de supraestructura, siendo la proteína de supraestructura seleccionada del grupo de 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 y una hemaglutinina quimérica, y la planta o material vegetal se cosecha.
- 50 7. El método de la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico se introduce en la planta de manera transitoria o en el que el ácido nucleico está integrado de forma estable dentro de un genoma de la planta.
8. El método de la reivindicación 1, en el que en la etapa de obtención (etapa a), se cultiva la planta y se recolecta la planta o la materia vegetal.
- 55 9. El método de la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo monoclonal o una hemaglutinina de influenza.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la materia vegetal se selecciona del grupo de hojas, células vegetales cultivadas y hojas enteras.

11. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de d) purificar la VLP o la supraestructura de proteínas, a partir de la fracción de contenido apoplásico.

12. El método de la reivindicación 11, en el que la etapa de d) purificación comprende filtrar la fracción de contenido apoplásico 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.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la separación se realiza por centrifugación, filtración en profundidad, o una combinación de los mismos.

15 14. El método de la reivindicación 5, en el que la concentración de la una o más de una pectinasa está entre el 0,01 % v/v al 2,5 % v/v.

15. El método de la reivindicación 5, en el que la concentración de la una o más de una celulasa está entre el 0,1 % al 5 % p/v.

20

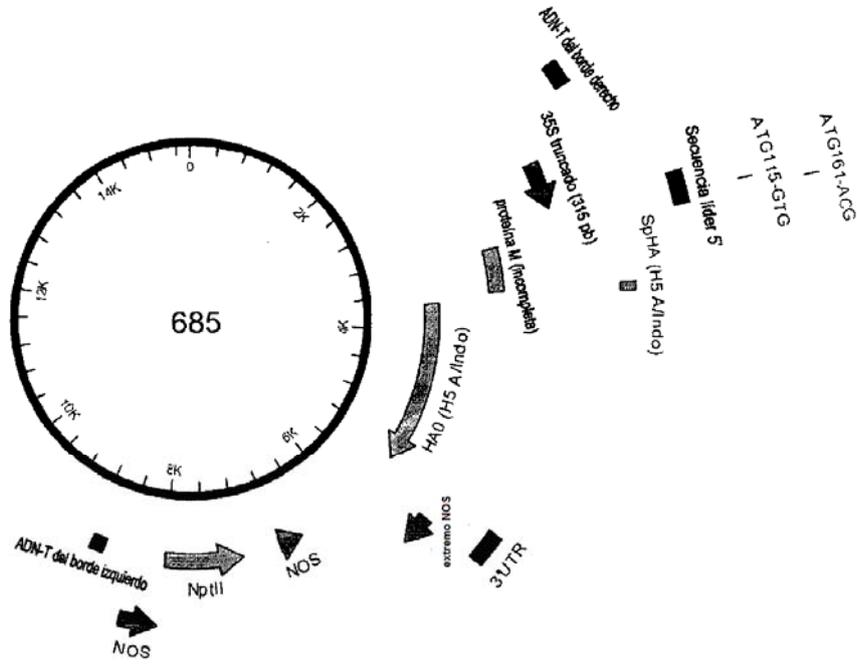


Figura 1

Figura 2A

TTAATTAAGAATTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACITTA  
TTGAGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAAGGAAAGGCCATC  
GTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCGAGGAGCATCGTGGAAAA  
AGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATG  
ACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGT  
ATTAATACTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACTTCTTCTAAACTC  
TCTCTCATCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGAT  
CGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTA  
GTGCGGCGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTTATCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTG  
CTGGAGGCTGCTGTTACAGCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTGACTTTCCGGCGGTGCAATATC  
TCTACTCTGCTTGACGAGGTATTGTGCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGATTTGGTCTATAA  
GAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGIGGTTTTCGAACITGGAGAAAAGATTGTTAAGCT  
CTGTATATCTGCCCCAAATTTGTGCGGCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGCATAGTCAGTCT  
TGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCA  
TGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGC  
GATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCC  
AATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAAACCAATG  
ACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAAGTGAAGAACCTTATTGAGCAGAAATAACCAT  
TTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA  
GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCTTTTTAGAAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACA  
TACCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATCCAACCAAGAGGATCTTTGGTACTGTGGGGAATTCA  
CCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAAACCACTATATTTCCATTTGGGA  
CATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAAGTAAACGGGCAAGTGGA  
AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTT  
ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGCAAGAAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGA  
ATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA  
ACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCCTTGCAACA  
GGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAG  
GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAG  
GGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCCCAATAAGGTCA  
ACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGGAGCCGTTGGAAGGGAAATTAATAACTTAGAAAAGG  
AGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGCTGGACTTATAATGCCGAACT  
TCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACCTTAGACTTTCTAGACTCAAATGTTAAGAACCCTTAGCAAA  
GGTCCGACTACAGCTTAGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAAT  
GTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAAACGGAACTGCAACTATCCGCAGTATTCAGAAAGAAAGCA  
AGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGTTAAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCAAACTACTGTCAAT  
TTATCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGATGTGCTC  
CAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATC  
GGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGGAGCGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAAATTT  
CTTTGTGAGCTCCTGTTAGCAGGTCGTCCTTCAAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTATATAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAACATTTGGC  
AATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTGCGGCTTTCGAGATGTTATCATATAAATTTCTGTGTAAT  
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAG  
TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACIAGGATAAATTTATCG  
CGCGGGTGTCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGGCGGCC

Figura 2B

MEKIVLLLAIVSLVKSQDQICGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVIHAQDILEKTHNGKLCDDLGDGVKPLILRDCS  
 VAGWLLGNPMCEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSPFNDYBELKHLISRINHFKEIQHPKSSWSDHEASS  
 GVSSACPYLGSPPFRNVVWLIKKNSTYPTIKKSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQRLYQNPTTYSIG  
 TSTLNQRLVPKIAITRSKVNGQSGRMEFFWTLKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGN  
 CNTKQCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKNRNLVATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQ  
 GMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKADGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKMM  
 EDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEYHKCDNECMESIR  
 NGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQLSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI

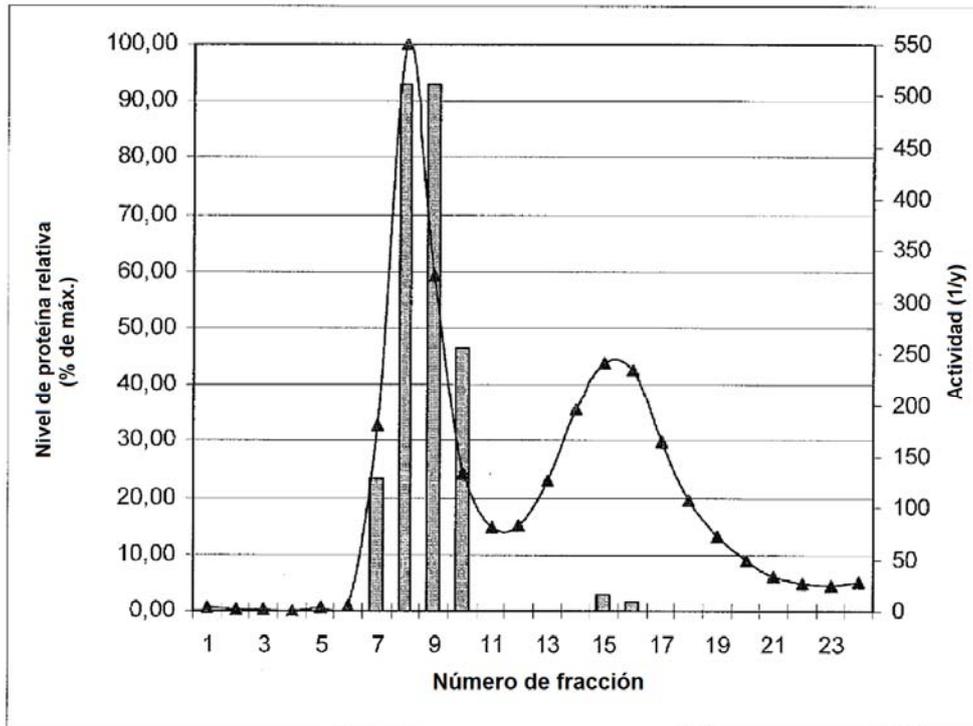


Figura 3A

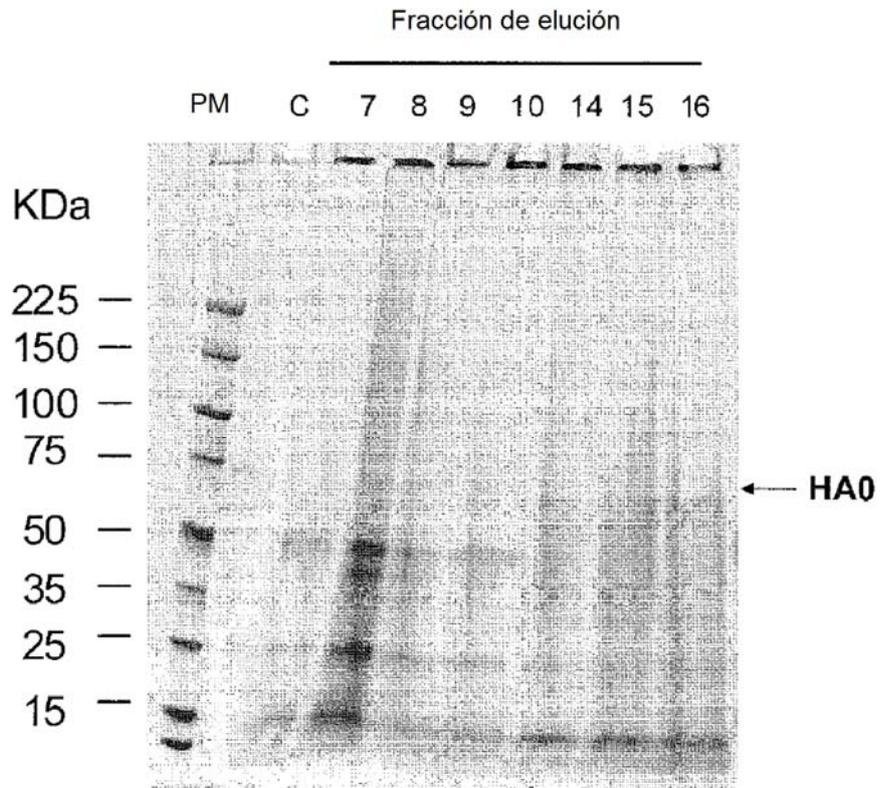


Figura 3B

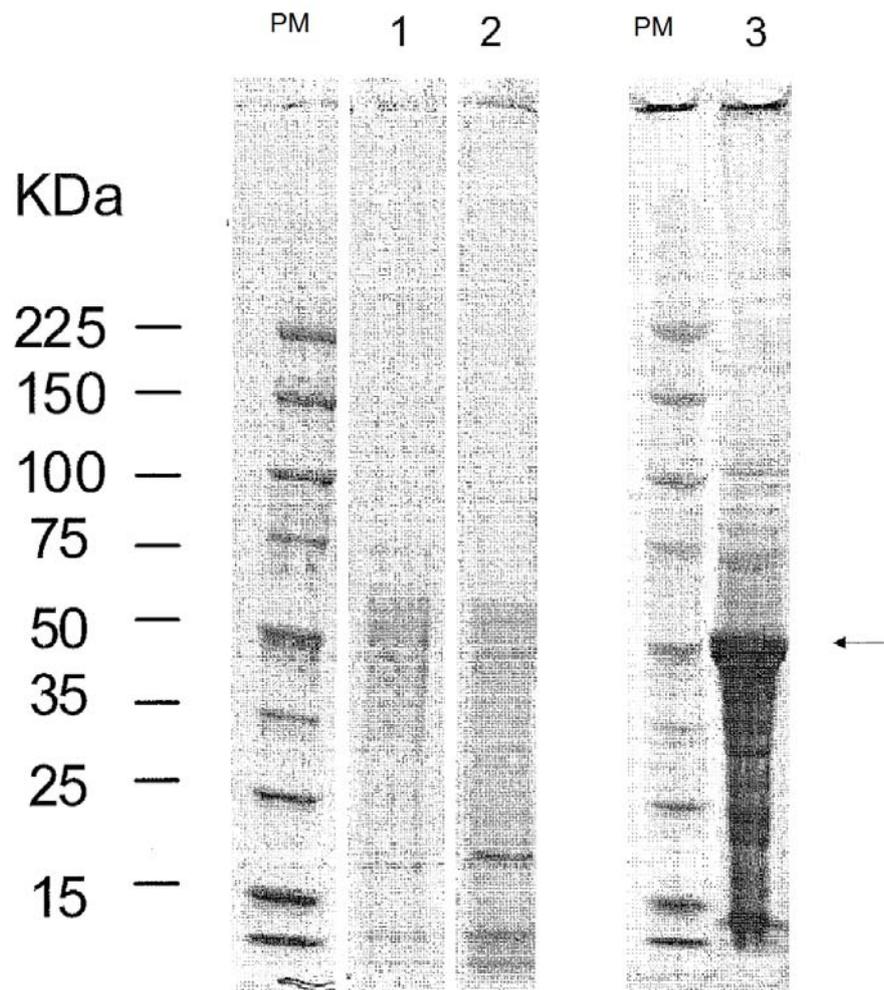


Figura 4

Figura 5

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAAGTTAGC  
AAGTGTGTACATTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAG  
AGTAAAGAAATATGGATGATAAAGAACAAGAGTAGTGTATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTG  
AGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAA  
TAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACAAAAATAGTTGTACAAATAT  
CATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCAT  
TAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATAAAAAGAAAGAATAAATTTTTAAAAAT  
TAAAAGTTGAGTCAATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATIGATGAAAGAGTTGGATTAAGTTG  
TATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA  
GTCAGTTAACTCAITTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA  
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCGTAGGAGGA  
TAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAAACCCTTTAAGCCACGCATCTGTGGC  
ACATCTACATTTATCTAAAACACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTT  
ATCACCCATTTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA  
GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGAGAAAAATAGTGCTTCTTCTGCAATA  
GTCAGTCTTGTAAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGAC  
ACAATCATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAA  
GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGG  
GAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAA  
CCAATGACCCTCTGTTACCCAGGGAGTTCAACGACTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAATA  
AACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTT  
AGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCTTTTGTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC  
AGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTGGTACTGTGGGG  
AATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCAT  
TGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACCGGGCAA  
GTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAATGGA  
AATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGTCAGAAAAGGGGACTCAGCAATTAAGAAAAGTGA  
ATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACCTCTAGTATGCCAT  
TCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCCTG  
CAACAGGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTAT  
AGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG  
AGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCCCAATAA  
GGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTGAGGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAG  
AAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCC  
GAACCTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTTAAGAACCTCTAC  
GACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA  
CAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAGTATTCAGAAG  
AAGCAAGATTA AAAAGAGAGGAAAATAAGTGGGGTAAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCAATACT  
GTCAATTTATCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGAT  
GTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAGAGCTTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTC  
CCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTTCCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTA  
TGAAATACTATTTGATGAGATGAAGTGGTGAATTAATTCATTACATAAGTGGAGTCAAGATCAG  
AATGTTTCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTACAATTTGCTTATATTTGAACAACATA  
AAATTTGAACATCTTTGGCCACAACCTTATAAGTGGTAAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATA  
GATTAATAATGGAAAATATCAGTTATCGAAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTAAATTT  
TATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

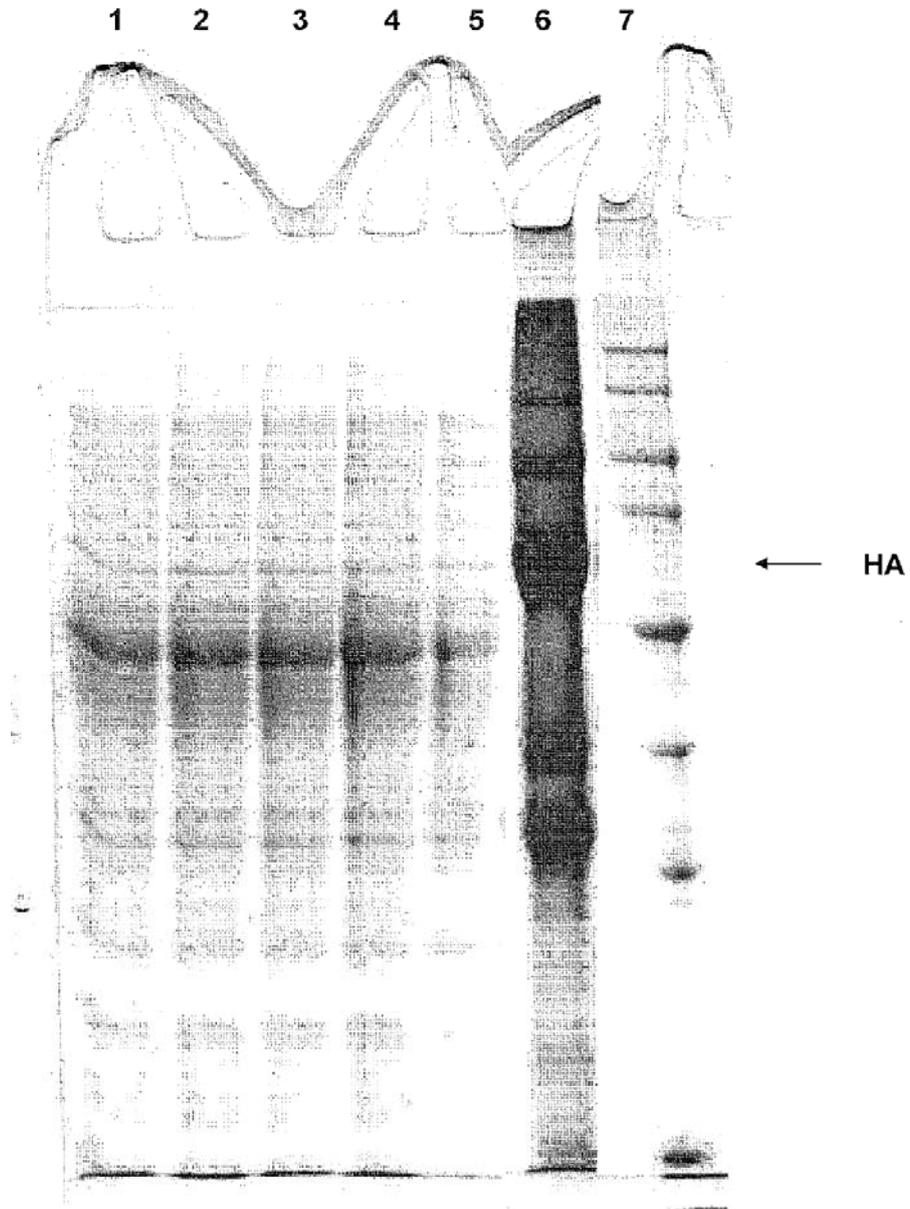


Figura 6

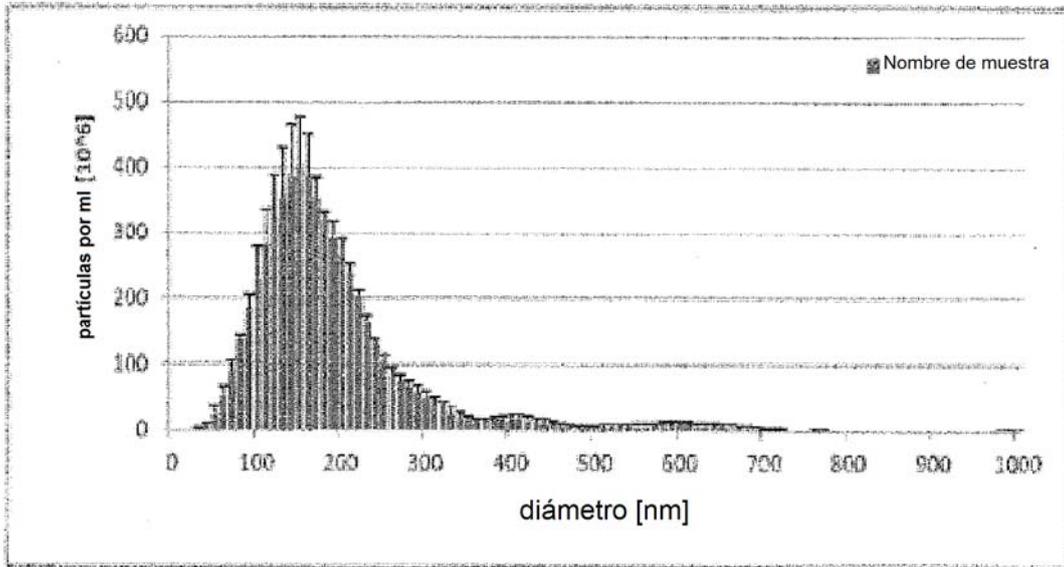


Figura 7A

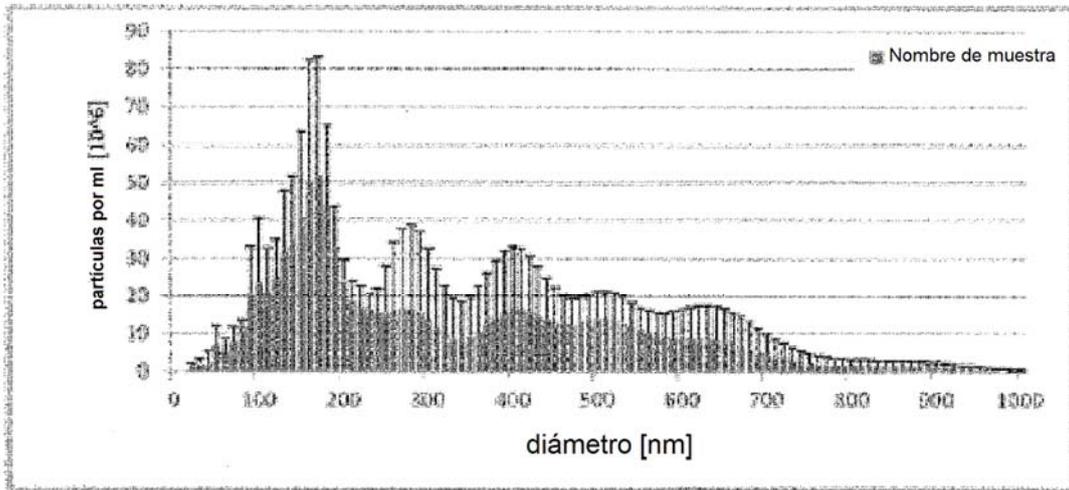


Figura 7B

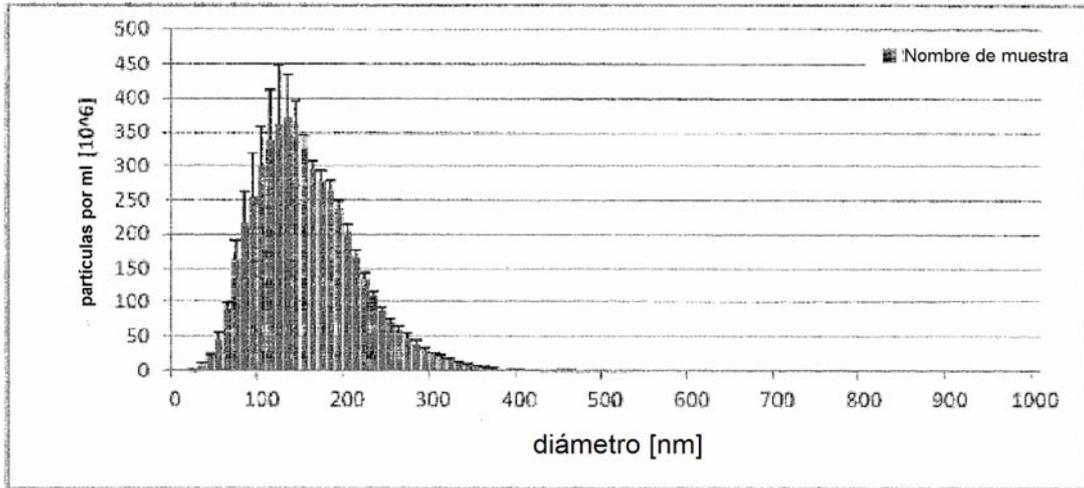


Figura 7C

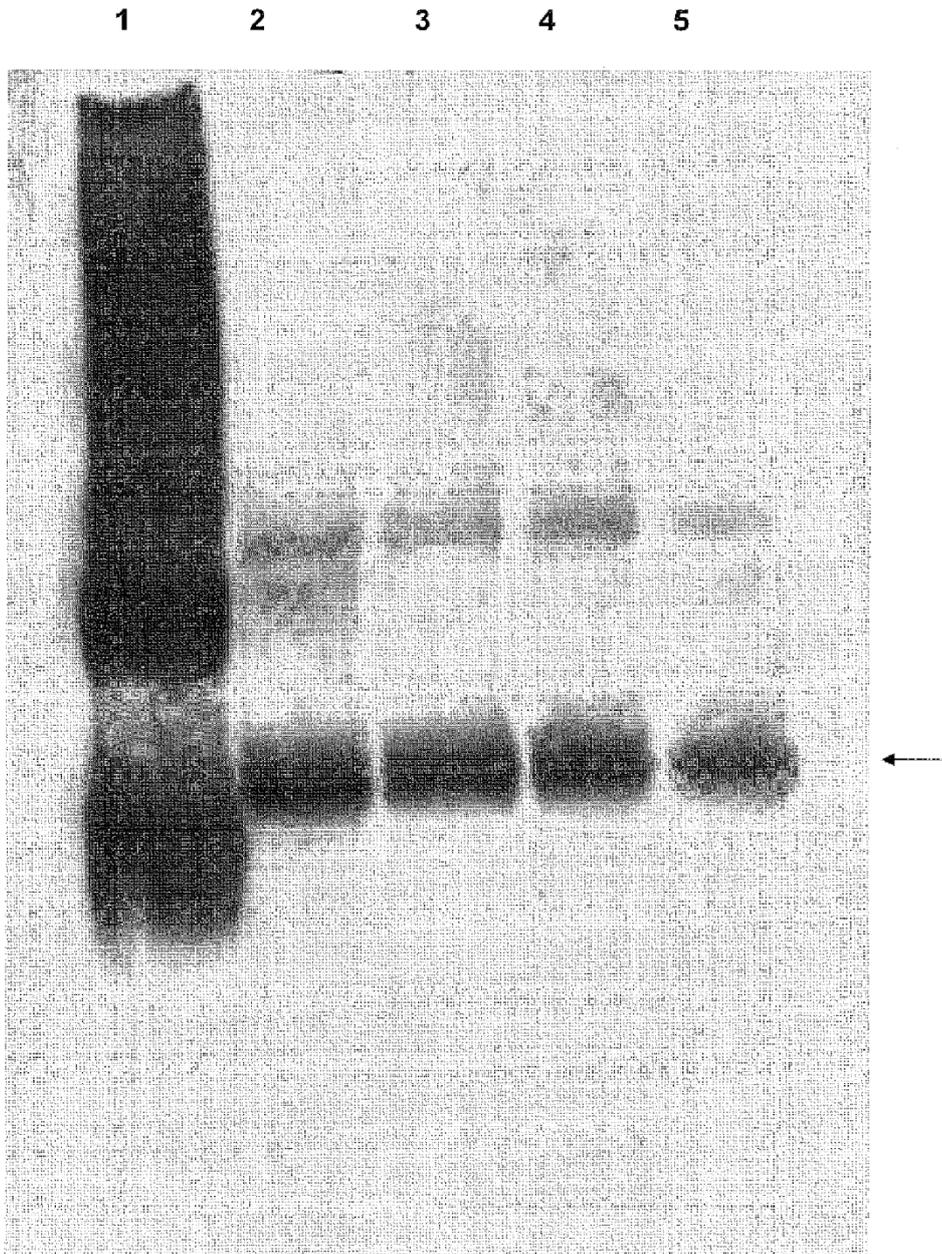


Figura 8

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT  
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAG  
CTTCCCTGCTAATCAGTGTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCC  
CAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCA  
GGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTC  
CCCCAAACCCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCCG  
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGAGTGGAGG  
CTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTT  
CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC  
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGC  
CCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC  
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA  
AAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG  
CTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGACGTCGTTAAAATGCTTCTTCGTCTCCTATTT  
ATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGT  
TGTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTA  
CATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAACTAGACATGAAGAC  
CTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAATAAAATTGAACATCTTTTGCCA  
CAACTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAA  
TAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAAC  
ACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGA  
ATTC

N.º 590 (Fragmento LC; SEQ ID NO.15)

Figura 9

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAA  
 TTAATCATCTTGAGAGAAAATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCCTTGTGCTGTTGCTACGC  
 GTGTCCTGTCCCAGGTACAACATGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
 AAGATGTCCTGCAAGGCTTC'TGGC'FACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAACAGAC  
 ACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATC  
 AGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC  
 AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGA  
 CTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCC  
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGGCCTGGGCTGC  
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG  
 CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACG  
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC  
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGC  
 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA  
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG  
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA  
 CAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC  
 AAAGGGCAGCCTAGGGAACCACAAGTGTACTCTTCCACCATCTAGGGATGAGCTTACTAAGAA  
 CCAAGTTTCTTACTTGTCTTGTGAAGGGATTTTATCCATCTGACATCGCCGTGGAATGGGAAT  
 CCAACGGACAACCAGAGAACAATTACAAGACTACTCCACCAGTTCTTGATTCTGATGGATCCTTC  
 TTTCTTTATTCCAAGCTTACTGTTGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGAAATGTGTTCTTGTTC  
 TGTTATGCACGAAGCTTTCATAATCATTATACTCAAAAGTCCCTTTCTTTCTCCTGGAAAGT  
 GAGACGTCGTTAAATGCTTCTTCGTCCTTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGT  
 CTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGT  
 AATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATG  
 AAGACCTGCCGCTACAATTGCTTATATTTGAACAACATAAATGAAATCTTTTGCCACAAC  
 TTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAATAATGGAAATATCAG  
 TTATCGAAATTCATTAACAATCACTTAACGTTATTAACACTACTAATTTTATATCATCCCTTTGA  
 TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGAATTC

N.º 592 (Fragmento HC; SEQ ID NO:16)

Figura 10

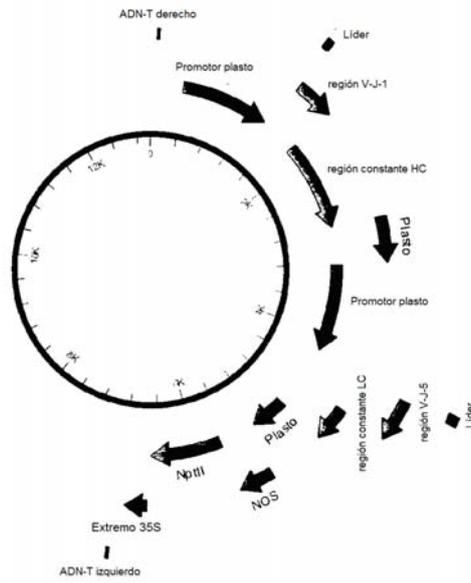


Figura 11A

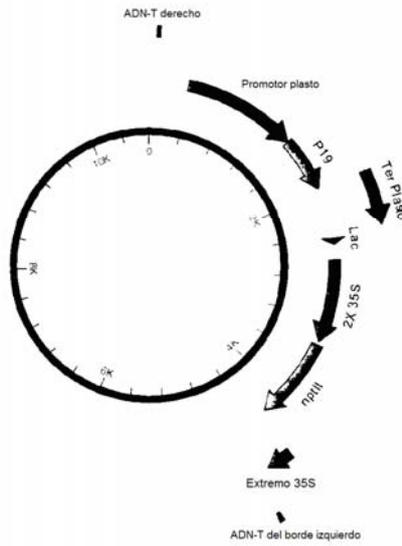


Figura 11B

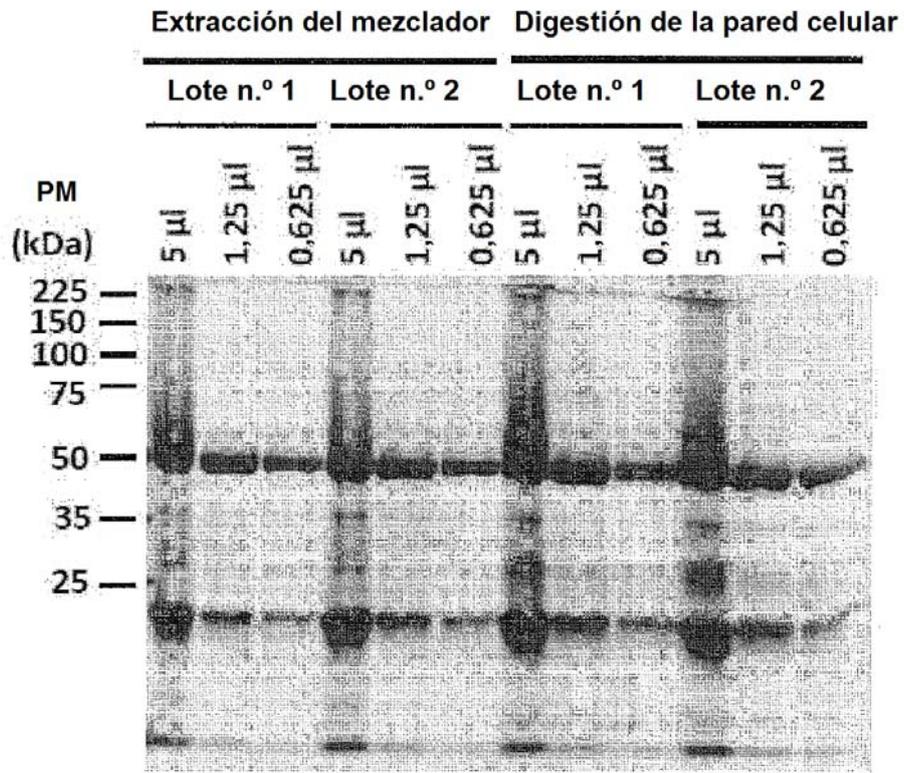
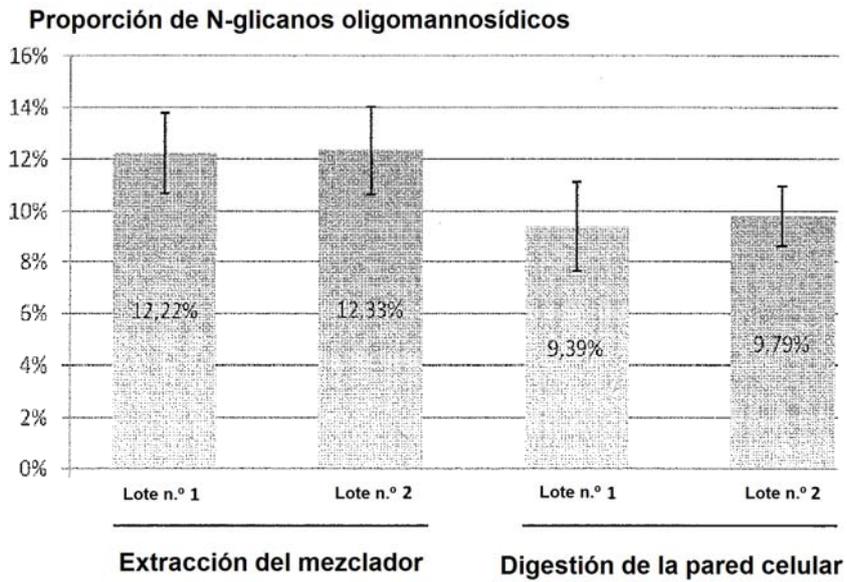


Figura 12

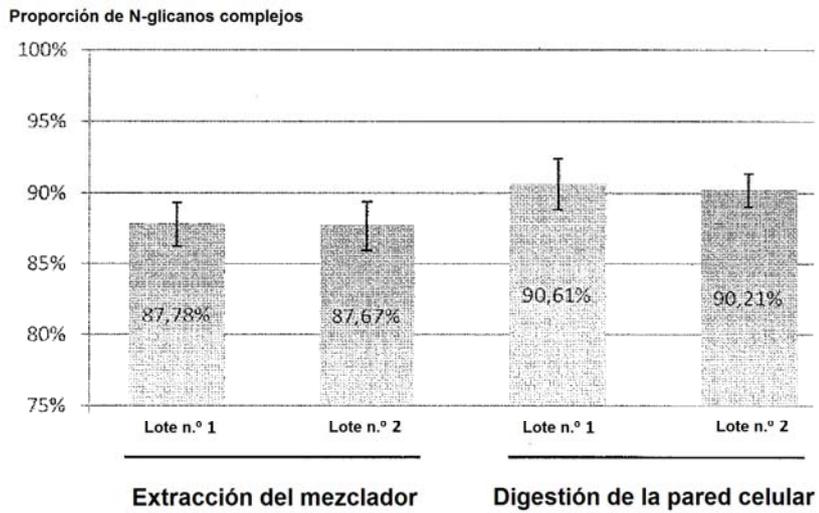


**Análisis estadístico**

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**



**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)	$1,41 \cdot 10^{-3}$ (**)

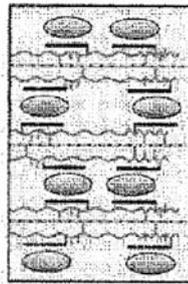
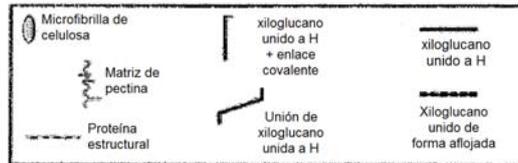
\*\* : La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es muy significativa (valor de p entre 0,01 y 0,1).  
 \*\*\* : La diferencia en la proporción de N-glicanos oligomannosídicos es altamente significativa (valor de p entre 0 y 0,01).

**Figura 13B**

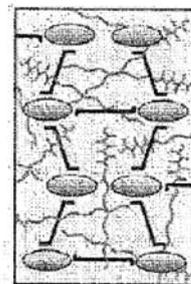
**Figura 14**

(Técnica anterior)

Clave de estructuras mostradas en los modelos de pared celular



**Figura 14A**



**Figura 14B**

Figura 15

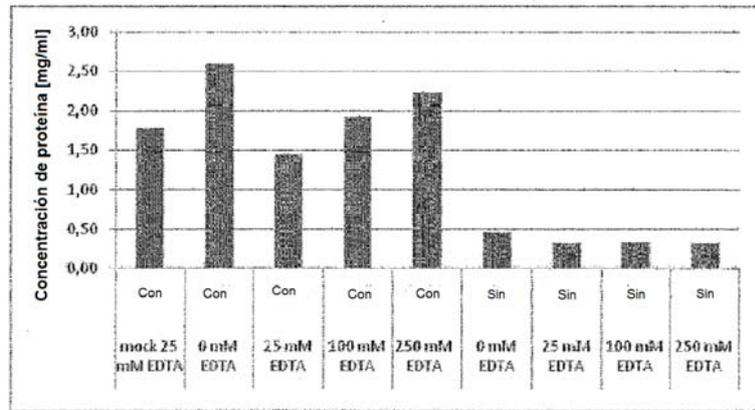


Figura 15A

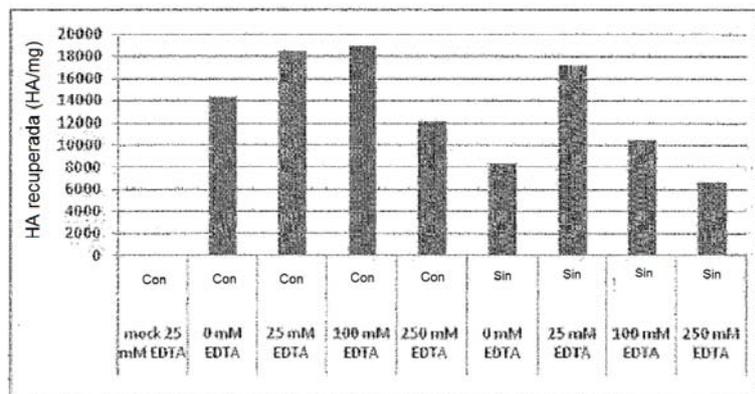


Figura 15B

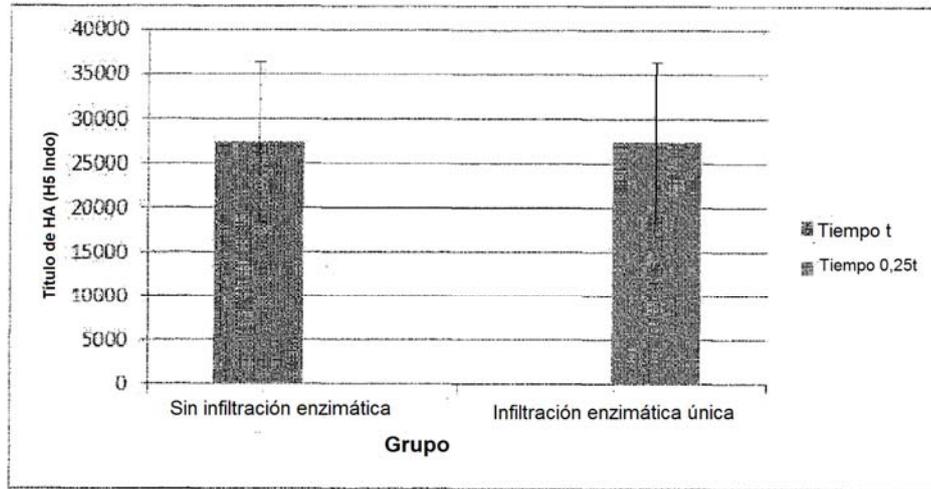


Figura 16A

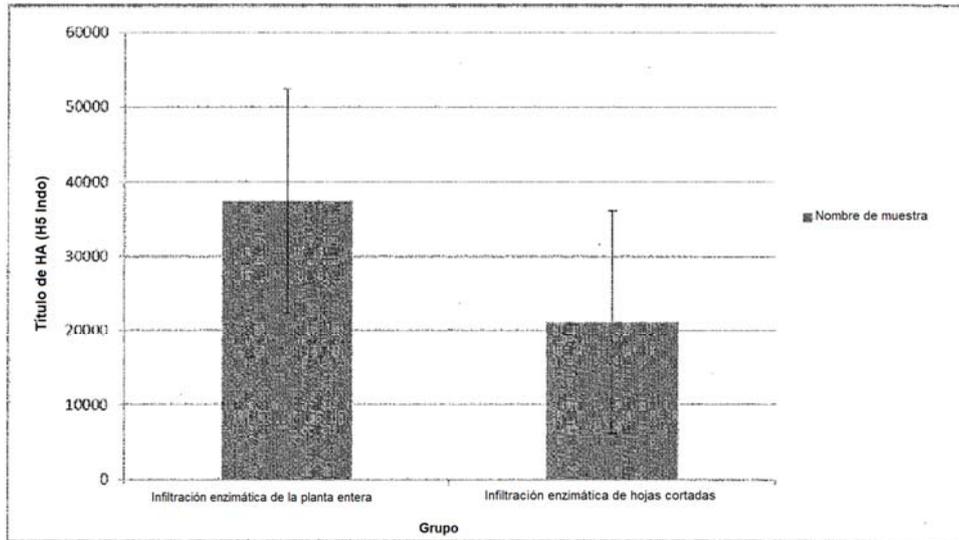


Figura 16B

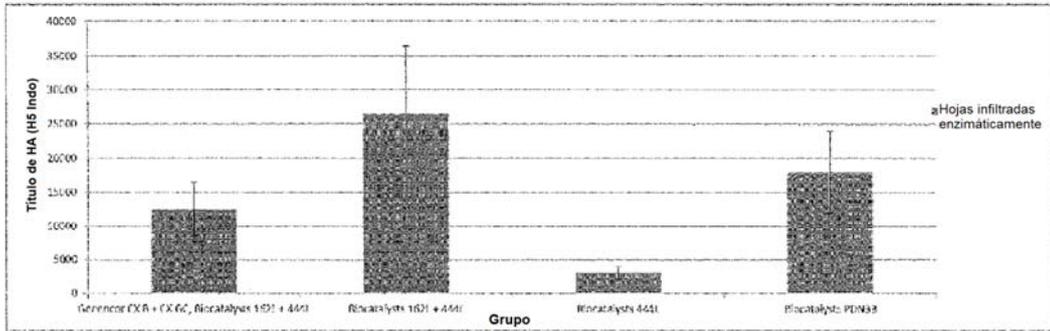


Figura 16C

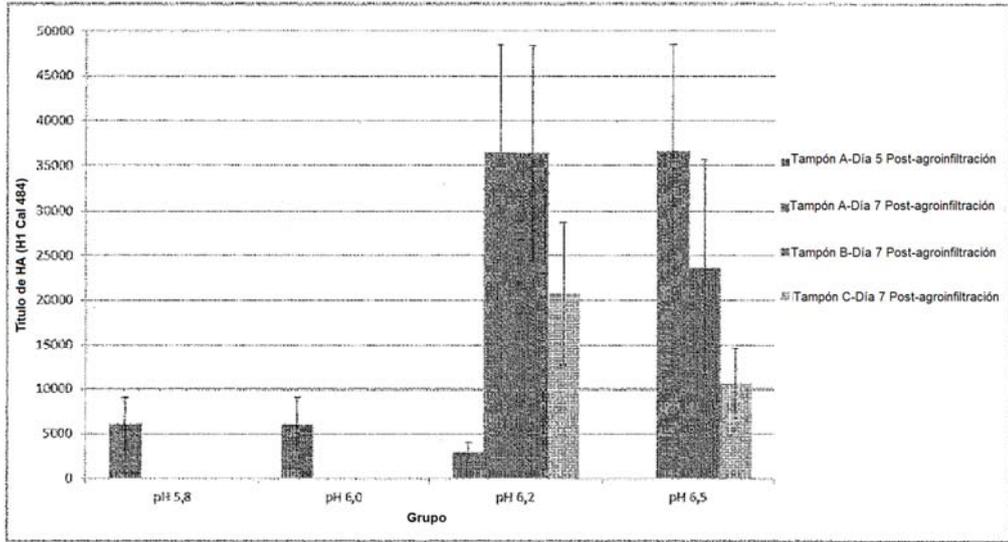


Figura 16D