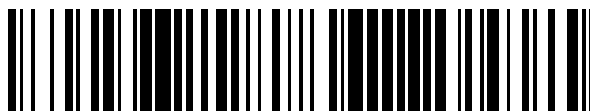


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 667**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2011** **PCT/EP2011/055358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11124612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011** **E 11712270 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2555614**

54 Título: **Administración específica de productos agroquímicos**

30 Prioridad:

06.04.2010 US 341930 P
06.04.2010 EP 10159100

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2019

73 Titular/es:

AGROSAVFE NV (100.0%)
Technologiepark 94
9052 Gent, BE

72 Inventor/es:

JONGEDIJK, ERIK y
VERHEESEN, PETER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 708 667 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

Administración específica de productos agroquímicos

La presente invención se refiere a la administración específica de productos agroquímicos a las plantas.

Antecedentes y técnica anterior

5 Durante muchos años, los horticultores y los agricultores han aplicado productos químicos para el control de malas hierbas, la protección de plantas y la regulación del crecimiento vegetal mediante pulverización de los campos. Para las composiciones que se tienen que aplicar sobre la planta, por ejemplo, sobre las hojas, solo una pequeña parte de la composición se une y es retenida sobre la parte de la planta en donde puede ejercer su actividad biológica ya que grandes cantidades no se adhieren a la superficie vegetal y se pierden por goteo o son arrastradas por la lluvia. 10 Además de proporcionare una eficacia reducida de los productos químicos, las pérdidas de productos químicos en el suelo debido a que gotean desde la planta durante la pulverización o debido a la pérdida por lavado durante una precipitación, pueden dar lugar a una contaminación de las aguas subterráneas, daño ambiental, pérdida de la biodiversidad y consecuencias para la salud humana y animal.

15 Diversos investigadores han tratado de resolver este problema mediante la aplicación a la planta de partículas de liberación lenta que se pegan a las hojas y liberan su contenido durante un cierto período de tiempo. El documento US 6180141 describe micropartículas de gel compuestas que se pueden utilizar para administrar principios activos para la protección de vegetales. El documento WO 2005102045 describe composiciones que comprenden al menos un compuesto fitoactivo y un adyuvante de la encapsulación, en donde el adyuvante comprende una célula fúngica o un fragmento de la misma, que confiere adherencia a la superficie de la hoja. El documento US 20070280981 describe 20 gránulos portadores, recubiertos con un agente pegajoso lipófilo en la superficie, con lo que el gránulo portador se adhiere a la superficie de plantas, céspedes y malas hierbas.

Esas micropartículas, destinadas a la administración de productos agroquímicos, se caracterizan por el hecho de que se adhieren a la planta mediante interacciones no específicas, más bien débiles, tales como una interacción lipófila. Aunque esta puede tener ventajas en comparación con la pulverización normal, la eficacia de tal método de 25 administración es limitada y las partículas puede ser que no se distribuyan de forma óptima sobre la hoja, o que sean arrastradas por el agua en condiciones climatológicas naturalmente variables, antes de que se complete la liberación del compuesto. Para una distribución específica y una retención eficaz de las micropartículas, se requiere una molécula específica que se una fuertemente, que pueda asegurar que el vehículo se adhiere a la planta hasta que su contenido se libere completamente.

30 Los dominios de unión a celulosa (CBDs) se han descrito como agentes útiles para la fijación de especies moleculares a la celulosa (documentos US 5.738.984 y US 6.124.117). De hecho, ya que el algodón se compone de hasta un 90% de celulosa, los CBDs han demostrado ser útiles para la administración de los llamados "agentes beneficiosos" sobre los tejidos de algodón, como se describe en el documento WO9800500, en donde se emplearon fusiones directas entre un CBD y una enzima, utilizando la afinidad del CBD para unirse a la tela de algodón. El uso de proteínas de fusión multifuncionales similares para el suministro de agentes beneficiosos encapsulados se reivindica en el documento WO03031477, en donde dichas proteínas de fusión multifuncionales consisten en un primer dominio de unión que es un dominio de unión a carbohidratos y un segundo dominio de unión, en donde o bien el primer dominio de unión o el segundo dominio de unión se puede unir a una micropartícula. El documento WO03031477 se ejemplifica mediante el uso de una proteína de fusión bifuncional que consiste en un CBD y un fragmento de anticuerpo anti-RR6 que se une a una micropartícula, en donde el complejo se deposita sobre hilos de algodón o hierba cortada. Sin embargo, el uso de tales proteínas de fusión multifuncionales para la administración de agentes beneficiosos encapsulados tiene una serie de inconvenientes graves: en primer lugar, aunque la celulosa es un componente principal de las paredes celulares vegetales y aproximadamente el 33% de todo el material vegetal consiste en celulosa, la celulosa en las plantas vivas intactas, está separada del entorno exterior por la cutícula vegetal, formada por cutina y ceras, que es una barrera impermeable con la que se recubren las paredes celulares de la planta, por lo que la celulosa es poco accesible para la unión a través de CBDs. En segundo lugar, una administración eficaz a la planta de un agente beneficioso encapsulado requiere la unión simultánea del primer dominio de unión a la planta y el segundo dominio de unión a la micropartícula. Como la probabilidad de que se produzcan ambos eventos de unión se determina por un delicado equilibrio entre las concentraciones molares de los dominios de unión y sus moléculas diana y la concentración molar del complejo unido, es muy poco probable que estén presentes suficientes proteínas de fusión multifuncionales en solución para permitir tal unión simultánea. Por otra parte, el equilibrio de un evento de unión está fuertemente influenciado por parámetros ambientales tales como la temperatura y el pH, para los que las condiciones óptimas pueden ser considerablemente diferentes para cada uno de los dominios de unión. Por lo tanto, es muy poco probable que tal unión simultánea de dos dominios de unión de tal proteína de fusión multifuncional dé lugar a una unión lo suficientemente fuerte para retener un agente beneficioso encapsulado en una planta. En tercer lugar, aunque la unión de un CBD es en cierta medida específica de la celulosa, el uso de una proteína de fusión multifuncional en la que el CBD debería unirse a la planta, se debe considerar como un enfoque de unión genérica, ya que todas las plantas contienen celulosa y por lo tanto es similar a una adhesión inespecífica de agentes de adherencia o de pegado. Un enfoque dirigido en el que una unión específica de un dominio de unión permitiera discriminar entre la unión a una especie vegetal frente a otra, tendría un valor considerablemente más 60

alto. El documento WO03031477 también sugiere, sin una ejemplificación adicional, que se pueden emplear otros aglutinantes de los hidratos de carbono o polisacáridos para generar proteínas de fusión para depositar micropartículas sobre organismos vivos. Sin embargo, en el documento WO03031477 no se describían ni dominios de unión distintos de CBDs, ni dominios de unión que se unen a plantas vivas intactas.

- 5 Las moléculas que son bien conocidas por su especificidad y alta afinidad hacia dianas particulares son los anticuerpos. Los anticuerpos se pueden generar contra una amplia variedad de dianas y se ha descrito que anticuerpos que se generaron para estudiar la estructura de la pared celular vegetal y la dinámica, se unen específicamente a determinados componentes de las plantas, predominantemente componentes de la pared celular vegetal (Penell et al., 1989; Jones et al., 1997; Willats et al., 1998; Willats y Knox, 1999; Willats et al., 2001). Sin embargo, no está claro si
- 10 cualquiera de los componentes de la pared celular vegetal contra los que se han generado dichos anticuerpos, sería directamente accesible para un anticuerpo desde el entorno exterior. Además, los anticuerpos son por su propia naturaleza, componentes del sistema inmune adaptativo, constituidos de tal manera que se unen a sus dianas en condiciones fisiológicas, incluyendo un pH estrictamente regulado, temperatura e intervalo de osmolaridad normal de la sangre. Si se considera el empleo de anticuerpos para la administración dirigida de productos agroquímicos, dichos anticuerpos no solo deben ser capaces de unirse a su diana en una planta viva intacta en una formulación agroquímica, para lo que las características fisicoquímicas se desvían sustancialmente de las condiciones fisiológicas, también deben ser capaces de unirse lo suficientemente fuerte como para retener un vehículo sobre una planta. Para ninguno de los anticuerpos que se unen a plantas descritos anteriormente, se ha demostrado ninguna de estas dos características cruciales.
- 20 Los dominios variables de anticuerpos de camélidos de cadena pesada (VHH) son un tipo de fragmentos de anticuerpos particularmente interesantes, ya que son pequeñas proteínas de cadena sencilla de 15 kDa, que se pueden seleccionar por mostrar una alta afinidad hacia sus dianas. Además, por su propia naturaleza como pequeñas moléculas de cadena sencilla, los VHH son fáciles de producir y tienen características de estabilidad superiores frente a los anticuerpos convencionales. Sin embargo, hasta ahora, no se ha descrito ningún VHH que se una a las plantas.
- 25 Además, aunque se ha observado que los VHH que se unen covalentemente a una partícula de resina sólida conservan la funcionalidad en el sentido de que son capaces de capturar un antígeno desde una solución (documento WO 0144301), no se ha mostrado, ni se puede esperar, que la afinidad de los VHH hacia su diana sea suficiente para retener un vehículo sobre una superficie sólida vegetal.
- 30 Todavía existe una necesidad no satisfecha de un método de administración específico para productos agroquímicos, en el que el producto agroquímico se administra o se deposita en su sitio de acción o cerca del mismo, en una planta viva intacta, utilizando un dominio de unión que se puede unir específica y fuertemente a plantas vivas intactas, y es capaz de retener un producto agroquímico o un vehículo que contiene dicho producto agroquímico sobre la planta.
- 35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente de direccionamiento hacia una diana, que comprende al menos un dominio de unión capaz de unirse a al menos un sitio de unión en una superficie vegetal, en donde dicho dominio de unión es un VHH, en donde el agente de direccionamiento está acoplado a al menos un producto agroquímico, o un vehículo que comprende o está unido a al menos un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, en donde el agente de direccionamiento es capaz de retener dicho producto agroquímico o vehículo sobre dicha superficie vegetal.
- 40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente invención para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos sobre una planta y/o una parte de la planta. En una realización preferida, el producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos se selecciona a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes o reguladores del crecimiento vegetal. En otra
- 45 realización preferida, el vehículo es un microvehículo. En una realización más preferida, el microvehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en microcápsulas, microesferas, nanocápsulas, nanoesferas, partículas de polímero, partículas hechas a partir de celulosa lignificada artificialmente, partículas de gel compuestas, partículas de resina débilmente iónicas, células microbianas o fragmentos de las mismas.
- 50 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, el agente de direccionamiento se acopla covalentemente a dicho vehículo. En una realización más preferida, el producto agroquímico se selecciona a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes o compuestos reguladores del crecimiento vegetal. En una realización aún más preferida, el vehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en microcápsulas, microesferas, partículas de polímero, partículas
- 55 formadas a partir de celulosa lignificada artificialmente, partículas de gel compuestas, partículas de resina débilmente iónicas, células microbianas o fragmentos de las mismas.

Descripción detallada de la invención

Se aislaron los dominios de unión, más específicamente los dominios de unión que comprendían una secuencia de aminoácidos que comprendía 4 regiones estructurales (FR) y 3 regiones determinantes de complementariedad

(CDR) (las definiciones de FR y CDR están de acuerdo con Kabat), en donde dichos dominios de unión son capaces de unirse a un sitio de unión en una planta viva intacta y, sorprendentemente, al hacerlo, son capaces de retener un producto agroquímico o un vehículo que contiene un producto agroquímico sobre dicha planta. Preferiblemente, dichos dominios de unión permanecen estables y conservan su capacidad de unión en condiciones muy duras, tales como temperatura, pH, concentración de sal, disponibilidad de agua o humedad variables; más preferiblemente, dichos dominios de unión permanecen estables y conservan su capacidad de unión en una formulación agroquímica. Los dominios de unión que comprenden 4 FRs y 3 CDRs, preferiblemente en una secuencia FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, son conocidos por la persona experta en la técnica y se han descrito, como un ejemplo no limitativo en Wesolowski et al. (2009). Preferiblemente, dichos dominios de unión se obtienen a partir de anticuerpos de camélidos, preferiblemente a partir de anticuerpos de camélidos de cadena pesada, desprovistos de cadenas ligeras, tales como los dominios variables de anticuerpos de camélidos de cadena pesada (VHH). Los agentes de direccionamiento que comprenden estos dominios de unión, pueden retener productos agroquímicos específicamente en sitios de unión en la planta o partes de la planta y se pueden utilizar para administrar y retener productos agroquímicos en la planta, preferiblemente en una planta viva intacta, por lo que los dominios de unión comprendidos en tales agentes de direccionamiento se unen específicamente a sitios de unión en la planta, en donde los productos agroquímicos pueden ejercer su actividad. Las composiciones agroquímicas que comprenden al menos un agente de direccionamiento y un producto agroquímico, unidos preferiblemente a o comprendidos en un vehículo, pueden ser adecuadas para permitir el uso de una dosis reducida del producto agroquímico y/o una reducción de la frecuencia de aplicación del producto agroquímico, comprendido en tal composición, mientras que se conserva su eficacia general. Además, cuando está comprendido en una composición de acuerdo con la invención, el producto agroquímico puede ejercer su actividad durante un período de tiempo más largo, dando lugar eventualmente a que se pierda menos producto agroquímico y que se contaminen menos el medio ambiente; también, mediante la aplicación de un producto agroquímico en una composición de acuerdo con la invención, es posible introducir una especificidad en la actividad del producto agroquímico que no está presente de otro modo.

Un primer aspecto de la presente descripción es un dominio de unión capaz de unirse a al menos un sitio de unión en una planta viva intacta.

Una "planta viva intacta", tal y como se emplea en esta memoria, significa una planta a medida que crece, tanto si crece en el suelo, sobre el agua o en un sustrato artificial y tanto si crece en el campo, en un invernadero, en un patio, en un jardín, en una maceta o en sistemas de cultivo hidropónico. Una planta viva intacta preferiblemente comprende todas partes de la planta (raíces, tallo, ramas, hojas, agujas, espinas, flores, semillas...) que están presentes normalmente en esa planta en la naturaleza, aunque algunas partes de la planta, tales como, por ejemplo, las flores, pueden estar ausentes durante ciertos períodos del ciclo de vida de la planta. Una planta viva intacta excluye partes de la planta que se han retirado de la planta, tales como las hojas y las flores que se han cortado y separado de la planta. Sin embargo, debe quedar claro que una planta viva intacta incluye plantas que han sido dañadas por fenómenos naturales normales, tales como daños por el clima (tales como, pero no limitados a, el viento, la lluvia o el granizo), por animales (ya sea por animales que se alimentan de las plantas o por animales que pisotean las plantas), por plagas vegetales (tales como, pero no limitadas a insectos, nematodos y hongos), o daños causados por la práctica agrícola, tales como, pero no limitados a, la poda, la recolección del fruto o la recolección de flores. Las plantas incluyen gimnospermas y angiospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, árboles, árboles frutales, cultivos de campo y vegetales y especies ornamentales. Como un ejemplo no limitativo, dichas plantas pueden ser cedros, cipreses, abetos, enebros, alerces, pinos, secoyas, abetos, tejos, ginkgo, palma de aceite, árbol del caucho, roble, haya, maíz, algodón, soja, trigo, arroz, cebada, centeno, sorgo, mijo, colza, frijoles, guisantes, cacahuets, girasol, patata, tomate, caña de azúcar, remolacha azucarera, yuca, tabaco, plátano, manzana, naranja, limón, olivo, piña, aguacate, vid, lechuga, col, zanahoria, berenjena, pimienta, melón, rosa, lirios, crisantemo, malas hierbas de tipo césped o de hoja ancha.

Un "sitio de unión", tal y como se emplea en esta memoria, significa una estructura molecular o un compuesto, tal como una proteína, un (poli)péptido, un (poli)sacárido, una glicoproteína, una lipoproteína, un ácido graso, un lípido o un ácido nucleico o una región particular en esa estructura molecular o compuesto o una conformación particular de esa estructura molecular o compuesto, o una combinación o complejo de tales estructuras moleculares o compuestos. Preferiblemente, dicho sitio de unión comprende al menos un antígeno. "Antígeno", tal y como se emplea en esta memoria, significa una molécula capaz de provocar una respuesta inmune en un animal. Preferiblemente, dicho sitio de unión está comprendido en una estructura de la planta tal como un tricoma, estoma, lenticelas, pinchos, espinas, pelos de la raíz, cutícula o capa de cera. Incluso más preferiblemente, dicho sitio de unión está comprendido en una estructura de la planta tal como un tricoma, estoma o cutícula. Dicho sitio de unión puede ser único para una estructura vegetal particular, o puede estar comprendido más generalmente en más de una estructura vegetal. Preferiblemente, dicho sitio de unión está presente en una parte particular de la planta, tal como las hojas, tallos, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos o tubérculos. Incluso más preferiblemente, dicho sitio de unión está presente en la superficie de esa parte particular de la planta, lo que significa que el sitio de unión está presente, por ejemplo, en la superficie de la hoja, la superficie del tallo, la superficie de la raíz, la superficie del fruto, la superficie de la piña, la superficie de la flor, la superficie del bulbo o la superficie del tubérculo. Dicho sitio de unión puede ser único para una parte de la planta en particular, o puede estar presente más generalmente en más de una parte de la planta.

Un "dominio de unión", tal y como se emplea en esta memoria, significa la totalidad o parte de una molécula proteí-

nica (proteína, semejante a proteína o que contiene una proteína) que es capaz de unirse mediante interacciones intermoleculares específicas a una molécula diana. Un dominio de unión puede ser una molécula de origen natural, por ejemplo fibronectina, que se puede obtener a partir de una molécula de origen natural, por ejemplo, a partir de componentes del sistema inmune innato o adaptativo, o puede estar diseñado completamente de forma artificial. Un dominio de unión se puede basar en una inmunoglobulina o se puede basar en dominios presentes en las proteínas, incluyendo pero no limitadas a proteínas microbianas, inhibidores de proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas enrolladas de una sola cadena antiparalela o proteínas con motivos repetidos. Ejemplos no limitantes de tales dominios de unión son dominios de unión a carbohidratos (CBD) (Blake et al., 2006), anticuerpos de cadena pesada (hcAb), anticuerpos de dominio sencillo (sdAb), minicuerpos (Tramontano et al., 1994), el dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélido (VHH), el dominio variable de los nuevos receptores de antígeno (VNAR), afucuerpos (Nygren et al., 2008), alfucuerpos (documento WO2010066740), dominios diseñados con repetición de anquirina (DARPin) (Stumpp et al., 2008), anticalinas (Skerra et al., 2008), knottins (Kolmar et al., 2008) y dominios CH2 modificados genéticamente (nanoanticuerpos; Dimitrov, 2009). Preferiblemente, dicho dominio de unión consiste en una sola cadena de polipéptido y no está modificado postraduccionalmente. Más preferiblemente, dicho dominio de unión no es un CBD. Incluso más preferiblemente, dicho dominio de unión se obtiene a partir de un sistema inmune innato o adaptativo, preferiblemente a partir de una proteína de un sistema inmune innato o adaptativo. Aún más preferiblemente, dicho dominio de unión se obtiene a partir de una inmunoglobulina. Lo más preferiblemente, dicho dominio de unión comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces contendrá por lo general al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad). Preferiblemente, un dominio de unión es fácil de producir con un rendimiento elevado, preferiblemente en un sistema de expresión recombinante microbiano y es adecuado para aislarlo y/o purificarlo posteriormente. También preferiblemente, un dominio de unión es estable, tanto durante el almacenamiento como durante la utilización, lo que significa que la integridad del dominio de unión se conserva durante las condiciones de almacenamiento y/o de utilización, que pueden incluir temperaturas elevadas, ciclos de congelamiento-descongelamiento, cambios en el pH o en la fuerza iónica, radiación UV, presencia de productos químicos nocivos y similares. Más preferiblemente, dicho dominio de unión es estable en una formulación agroquímica. Una "formulación agroquímica" tal y como se emplea en esta memoria significa una composición para uso agroquímico, como se ha definido anteriormente, que comprende al menos una sustancia activa, opcionalmente con uno o varios aditivos que favorecen la dispersión óptima, la atomización, el depósito, la humectación de las hojas, la distribución, la retención y/o la captura de productos agroquímicos. Como un ejemplo no limitante, tales aditivos son diluyentes, disolventes, adyuvantes, agentes tensioactivos, agentes humectantes, agentes de difusión, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes tamponantes, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas y/o agentes de control de la deriva. Lo más preferiblemente, dicho dominio de unión se mantiene estable en una formulación agroquímica cuando se almacena a temperatura ambiente durante un período de dos años o cuando se almacena a 54°C durante un período de dos semanas. Preferiblemente, dicho dominio de unión se selecciona a partir del grupo que consiste en DARPin, knottins, alfucuerpos y VHH. Más preferiblemente, dicho dominio de unión se selecciona a partir del grupo que consiste en alfucuerpos y VHH. Más preferiblemente, dicho dominio de unión es un VHH.

La unión del dominio de unión al sitio de unión o a un antígeno comprendido en el sitio de unión se produce con alta afinidad. La constante de disociación se usa comúnmente para describir la afinidad entre un dominio de unión y su molécula diana. Preferiblemente, la constante de disociación de la unión entre el dominio de unión y la molécula diana comprendida en el sitio de unión es menor que 10^{-5} M, más preferiblemente, la constante de disociación es menor que 10^{-6} M, incluso más preferiblemente, la constante de disociación es menor que 10^{-7} M, lo más preferiblemente, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M. Preferiblemente, la unión del dominio de unión al sitio de unión es específica, lo que significa que el dominio de unión se une al sitio de unión solo si la molécula diana está presente en el sitio de unión y que el dominio de unión no se une, o se une con mucha menor afinidad, a un sitio de unión que carece de la molécula diana. La especificidad de la unión de un dominio de unión se puede analizar por métodos tales como ELISA, como se describe en el ejemplo 2, en donde la unión del dominio de unión a su molécula diana se compara con la unión del dominio de unión a una molécula no relacionada y con adherencia no específica del dominio de unión con el recipiente de reacción. La especificidad también se puede expresar como la diferencia en la afinidad de un dominio de unión hacia su molécula diana, en comparación con la afinidad hacia una molécula no relacionada. Preferiblemente, la relación de la afinidad del dominio de unión hacia su molécula diana en comparación con su afinidad hacia una molécula no relacionada, es mayor que 10, más preferiblemente dicha relación es mayor que 20, lo más preferiblemente dicha relación es mayor que 100. La unión del dominio de unión puede ser específica para una estructura vegetal particular, lo que significa que el sitio de unión, comprendido en tal estructura vegetal, no está presente o está presente en un grado mucho menor en otras estructuras de la planta, o la unión puede ser más general con más de una estructura de la planta, si el sitio de unión está presente en más de una estructura de la planta. La unión del dominio de unión puede ser específica para una parte de la planta particular, lo que significa que el sitio de unión, presente en o sobre dicha parte de la planta, posiblemente comprendida en una estructura de la planta sobre esa parte de la planta, no está presente o está presente en un grado mucho menor en otras partes de la planta o la unión puede ser más general con más de una parte de la planta, si el sitio de unión está presente en más de una parte de la planta. La unión del dominio de unión puede ser específica de una especie vegetal particular, lo que significa que el sitio de unión, presente en o sobre esa especie vegetal, no está presente o está presente en un grado mucho menor en otras especies vegetales; o la unión puede ser más general con más de

una especie vegetal, si el sitio de unión está presente en más de una especie vegetal. La unión del dominio de unión puede ser específica de un género vegetal particular, lo que significa que el sitio de unión, presente en o sobre ese género vegetal, no está presente o está presente en un grado mucho menor en otros géneros vegetales; o la unión puede ser más general con más de un género vegetal, si el sitio de unión está presente en más de un género vegetal. La unión del dominio de unión puede ser específica de un estadio de crecimiento particular de la planta, lo que significa que el sitio de unión, presente en o sobre esa planta en un estadio de crecimiento particular, no está presente o está presente en un grado mucho menor en la planta en otro estadio del crecimiento; o la unión puede ser más general con más de un estadio de crecimiento de la planta, si el sitio de unión está presente en más de un estadio de crecimiento de la planta. Todos los tipos de especificidad de unión de los dominios de unión pueden tener su uso específico, tal como se explicará a continuación.

Preferiblemente, la unión del dominio de unión al sitio de unión sigue siendo funcional en condiciones muy duras, tales como una temperatura baja o alta, pH bajo o alto, fuerza iónica baja o alta, radiación UV, baja disponibilidad de agua, presencia de productos químicos desnaturalizantes o similares. En una realización preferida, dichas condiciones duras se definen por un intervalo de pH de 4 a 9, más preferiblemente por un intervalo de pH de 3 a 10, incluso más preferiblemente por un intervalo de pH de 2 a 10, lo más preferiblemente por un intervalo de pH de 1 a 11. En otra realización preferida, dichas condiciones duras se definen por un intervalo de temperatura de 4-50°C, más preferiblemente un intervalo de temperatura de 0-55°C, incluso más preferiblemente un intervalo de temperatura de 0-60°C. En otra realización preferida, dichas condiciones duras se definen por la presencia de una formulación agroquímica como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, la unión del dominio de unión al sitio de unión es lo suficientemente fuerte para unirse, más preferiblemente para retener, un vehículo en dicho sitio de unión; dependiendo del tamaño del vehículo y de la afinidad del dominio de unión, uno o varios dominios de unión pueden unirse a uno o varios sitios de unión y cooperar de tal manera que la avidéz resultante de los dominios de unión hacia el o los sitios de unión asegura una unión fuerte del vehículo, reteniendo preferiblemente el vehículo sobre la planta. Un "vehículo", tal y como se emplea en esta memoria, significa cualquier vehículo sólido, semisólido o líquido en o sobre el cual, una sustancia activa se puede incorporar, incluir, inmovilizar, adsorber, absorber, unir, encapsular, incrustar, fijar o estar comprendida adecuadamente. Ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen nanocápsulas, microcápsulas, nanoesferas, microesferas, nanopartículas, micropartículas, liposomas, vesículas, gotas, un gel, partículas de resina iónica débil, liposomas, vehículos de entrega de cocleatos, pequeños gránulos, granulados, nanotubos, bolas bucky, gotitas de agua que forman parte de una emulsión de agua-en-aceite, gotitas de aceite que forman parte de una emulsión de aceite-en-agua, materiales orgánicos tales como corcho, madera u otros materiales derivados de plantas (por ejemplo en forma de vainas de semillas, virutas de madera, pulpa, esferas, perlas, láminas o cualquier otra forma adecuada), papel o cartón, materiales inorgánicos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina, silicatos y zeolitas, o incluso células microbianas (tales como células de levadura) o fracciones adecuadas o fragmentos de las mismas (como se describe adicionalmente en el presente documento). "Retener" tal y como se emplea en esta memoria, significa que la fuerza de la unión que resulta de la afinidad o la avidéz de un dominio de unión aislado o de una combinación de dos o más dominios de unión, hacia su o sus sitios de unión, es mayor que la fuerza combinada y el par motor impuestos por la gravedad del vehículo, la fuerza y el par motor, en su caso, causados por el flujo o el goteo de una solución agroquímica pulverizada y la fuerza y el par motor, en su caso, impuestos por las fuerzas de cizallamiento causadas por uno o varios factores externos. En una realización preferida, dicho factor externo es la lluvia, irrigación, nieve, granizo o viento. Una ventaja particular de unirse a un vehículo mediante una unión específica, sobre una unión inespecífica, es que la unión específica es más resistente a las fuerzas de cizallamiento externas aplicadas sobre el vehículo (Cozens-Roberts et al., 1990).

Preferiblemente, un dominio de unión de acuerdo con la presente descripción se une a un sitio de unión o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, presente en o sobre una o varias partes particulares de la planta viva intacta. Preferiblemente, dichas partes de la planta viva intacta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos o tubérculos. Más preferiblemente, dichas partes de la planta viva intacta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo o raíces. Preferiblemente, un dominio de unión de acuerdo con la invención se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en la superficie de la planta viva intacta. Una "superficie", tal y como se emplea en esta memoria, puede ser cualquier superficie, tal y como está presente en la planta viva intacta; o en una o varias partes de la planta viva intacta, sin embargo, se excluyen preparaciones histológicas de las plantas. Preferiblemente, dicha superficie de la planta viva intacta es la superficie de una parte de la planta viva intacta, seleccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la hoja, la superficie del tallo, la superficie de la raíz, la superficie del fruto, la superficie de la piña, la superficie de la flor, la superficie del bulbo o la superficie del tubérculo; incluso más preferiblemente dicha superficie de la planta viva intacta es la superficie de una parte de la planta viva intacta, seleccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la raíz, la superficie del tallo y la superficie de la hoja.

Preferiblemente, un dominio de unión de acuerdo con la presente descripción se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre una estructura particular de la planta viva intacta o en o sobre una estructura particular de una parte particular de la planta viva intacta; más preferiblemente en o sobre una estructura particular implicada o involucrada en el transporte de nutrientes, productos agroquímicos u otros productos químicos a la planta y/o implicada o involucrada en la defensa de la planta. Preferiblemente, dicha estructura particular se selecciona a partir del grupo que consiste en tricomas, estomas, lenticelas, pinchos, espinas, pelos de la raíz,

cutícula y capa de cera, aún más preferiblemente dicha estructura particular se selecciona a partir del grupo que consiste en tricomas, estomas y cutícula. En una realización preferida, dicho dominio de unión se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los tricomas de la planta. Los tricomas de la planta son conocidos por la persona experta en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a tricomas glandulares y pelos de la hoja. Los tricomas de la planta son activos en la defensa de la planta (Lai et al., 2000), pero especialmente los tricomas no glandulares también se citan como posibles dianas para una infección (Calo et al., 2006). Los tricomas, incluyendo los tricomas glandulares, también están implicados en el transporte de compuestos polares a través de las cutículas de las plantas dentro de la planta (Schreiber, 2005). Esto hace que los tricomas sean una diana ideal para la administración de productos agroquímicos, ya sea incrementando la defensa natural o mediante la concentración de productos agroquímicos en el sitio de ataque o mejorando la administración de productos agroquímicos (polares) dentro de la planta. En otra realización preferida, dicho dominio de unión se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los estomas. Los estomas son esenciales para permitir que el CO₂ se difunda dentro de la planta y para minimizar la pérdida de agua. Los estomas también se utilizan como un sitio de entrada importante para los agentes patógenos, especialmente los microbios (Underwood et al. 2007). "Microbios", tal y como se emplea en esta memoria, significa bacterias, virus, hongos y similares. Por otra parte están implicados directamente en la defensa de la planta a través de vías de señalización específicas que permiten a una planta cerrar los estomas a consecuencia de una infección microbiana (Melotto et al., 2006). En aún otra realización preferida, dicho dominio de unión se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los pelos de la raíz. Los pelos de la raíz son conocidos por ser importantes para la fijación microbiana y la colonización de las plantas (Gage, 2004; Laus et al., 2005) y por lo tanto son una diana importante para la administración de productos agroquímicos. En otra realización preferida, dicho dominio de unión se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre la cutícula de la planta. Las cutículas de las plantas son conocidas por ser importantes para la fijación microbiana y la colonización de las plantas y por tener un papel importante en la administración y el depósito de productos agroquímicos lipofílicos dentro de la planta (Schreiber, 2005) y por lo tanto son una diana importante para la administración y el depósito de productos agroquímicos.

En una realización preferida, el dominio de unión de acuerdo con la invención se une a goma arábiga. En otra realización preferida, dicho dominio de unión se une a lectinas, dominios similares a lectina, extensinas o dominios similares a extensina; más preferiblemente dicho dominio de unión se une a la lectina de la patata. Preferiblemente, dicho dominio de unión comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contendrán al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad); más preferiblemente, dicho dominio de unión se obtiene a partir de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferiblemente, dicho dominio de unión comprende una secuencia de VHH. Los anticuerpos de camélido de cadena pesada y las secuencias obtenidas a partir de VHH son conocidos por la persona experta en la técnica. Los anticuerpos de camélido se han descrito, entre otros, en los documentos WO9404678 y WO2007118670. Todavía incluso más preferiblemente, dicho VHH comprende dos puentes disulfuro. La mayoría de las moléculas de VHH tienen solo un puente disulfuro; la presencia de un puente disulfuro adicional dará una estabilidad extra al dominio del anticuerpo, lo que es una característica ventajosa para un dominio de unión que tiene que ser estable en condiciones duras. Lo más preferiblemente, dicho VHH comprende, preferiblemente consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 - SEQ ID N° 42 (3A2, 3B4, 3B7, 3D10, 3D2, 3D8, 3E6, 3F5, 3F7, 3F9, 3G2, 3G4, 3H10, 3H8, 4A1, 5B5, 5B6, 5C4, 5C5, 5D4, 5E5, 5F5, 5G2, 5G5, 5H5, 7A2, 7C2, 7D2, 7E1_1, 7F1, 8B10, 8B12, 9A1, 9B5, 9C4, 9D5, 9E1, 9E4, 9F4, 9H1, 9H2 y 12H4), o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces contendrá por lo general al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad) u homólogos de las mismas. Los homólogos, tal y como se emplean en esta memoria, son secuencias en las que cada o cualquier región estructural y cada o cualquier región determinante de complementariedad muestra al menos 80% de identidad, preferiblemente al menos 85% de identidad, más preferiblemente 90% de identidad, más preferiblemente incluso 95% de identidad con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir, FR1_homologue frente a FR1_reference, CDR1_homologue frente a CDR1_reference, FR2_homologue frente a FR2_reference, CDR2_homologue frente a CDR2_reference, FR3_homologue frente a FR3_reference, CDR3_homologue frente a CDR3_reference y FR4_homologue frente a FR4_reference) tal como se mide en una alineación BLASTp (Altschul et al., 1997; las definiciones de FR y CDR de acuerdo con Kabat).

Un segundo aspecto de la presente descripción es un agente de direccionamiento, capaz de retener un producto agroquímico sobre una planta y/o una parte de la planta.

Un "agente de direccionamiento", tal y como se emplea en esta memoria, es una estructura molecular, de preferencia con una cadena principal de polipéptido, que comprende al menos un dominio de unión. Un agente de direccionamiento en su forma más simple consiste solamente en un dominio de unión único; sin embargo, un agente de direccionamiento puede comprender más de un dominio de unión y puede ser monovalente o multivalente y mono-específico o multispecífico, como se ha definido adicionalmente. Aparte de un dominio de unión único o múltiples, un agente de direccionamiento puede comprender además otros restos, que pueden estar o bien acoplados químicamente o fusionados, tanto por el extremo N-terminal como C-terminal, o incluso fusionados internamente con el dominio de unión. Dichos otros restos incluyen, sin limitación, uno o varios aminoácidos, incluyendo aminoácidos marcados (por ejemplo, marcados con fluorescencia o radiactivamente) o aminoácidos detectable (por ejemplo,

detectables con un anticuerpo), uno o varios monosacáridos, uno o varios oligosacáridos, uno o varios polisacáridos, uno o varios lípidos, uno o varios ácidos grasos, una o varias moléculas pequeñas o cualquier combinación de los anteriores. En una realización preferida, dichos otros restos actúan como espaciadores o enlazadores en dicho agente de direccionamiento.

5 "Productos agroquímicos", tal y como se emplea en esta memoria, significa cualquier sustancia o principio activo que se puede utilizar en la industria agroquímica (incluyendo agricultura, horticultura, floricultura y usos domésticos y de jardinería, pero también productos con usos no relacionados con los cultivos, tales como usos como operador de control de salud pública/plagas para controlar insectos y roedores no deseables, usos domésticos, como fungicidas e insecticidas domésticos y agentes para la protección de plantas o partes de plantas, cultivos, bulbos, tubérculos, frutos (por ejemplo, de organismos nocivos, enfermedades o plagas); para controlar, preferentemente favoreciendo o aumentando el crecimiento de las plantas; y/o para favorecer la producción de plantas, cultivos o las partes de las plantas que se cosechan (p. ej., sus frutos, flores, semillas, etc.). Ejemplos de tales sustancias serán evidentes para el experto en la materia y pueden incluir por ejemplo compuestos que son activos como insecticidas (por ejemplo, insecticidas de contacto o insecticidas sistémicos, incluyendo insecticidas de uso doméstico), herbicidas (por ejemplo, herbicidas de contacto o herbicidas sistémicos, incluyendo herbicidas para uso doméstico), fungicidas (por ejemplo, fungicidas de contacto o fungicidas sistémicos, incluyendo fungicidas para uso doméstico), nematocidas (por ejemplo, nematocidas de contacto o nematocidas sistémicos, incluyendo nematocidas para uso doméstico) y otros plaguicidas o biocidas (por ejemplo agentes para matar insectos o caracoles); así como fertilizantes; reguladores del crecimiento tales como hormonas vegetales; micronutrientes, protectores, feromonas; repelentes; cebos de insectos; y/o principios activos que se utilizan para modular (es decir, aumentar, disminuir, inhibir, mejorar y/o incentivar) la expresión de un gen (y/u otros procesos biológicos o bioquímicos) en o a través de la planta específica (por ejemplo, la planta que se va a proteger o la planta que se va a controlar), tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de cadena sencilla o de cadena doble, como se emplea por ejemplo en el contexto de la tecnología de ARNi) y otros factores, proteínas, productos químicos, etc. conocidos por sí mismos para este propósito, etc. Ejemplos de tales productos agroquímicos serán evidentes para el experto en la materia; e incluyen, por ejemplo, sin limitación: glifosato, paraquat, metolaclor, acetoclor, mesotriona, 2,4-D, atrazina, glufosinato, sulfosato, fenoxaprop, pendimetalina, picloram, trifluralina, bromoxinil, clodinafop, fluroxipir, nicosulfuron, bensulfuron, imazetapir, dicamba, imidacloprida, tiametoxam, fipronil, clorpirifos, deltametrina, lambda cihalotrina, endosulfán, metamidofos, carbofurán, clotianidina, cipermetrina, abamectina, diflufenicán, espinosad, indoxacarb, bifentrina, teflutrina, azoxistrobina, tiametoxam, tebuconazol, mancozeb, ciazofamida, fluazinam, piraclostrobina, epoxiconazol, clorotalonil, fungicidas de cobre, trifloxistrobina, protioconazol, difenoconazol, carbendazim, propiconazol, tiofanato, azufre, boscalida y otros productos agroquímicos conocidos o cualquier combinación o combinaciones adecuadas de los mismos. Otros productos agroquímicos adecuados serán evidentes para el experto en la materia basándose en la descripción en el presente documento y pueden ser, por ejemplo, cualquier producto agroquímico disponible comercialmente e incluyen, por ejemplo, cada uno de los compuestos mencionados en Phillips McDougall, AgriService Noviembre 2007 V4.0, Products Section - 2006 Market, Product Index pp. 10-20. Dicho producto agroquímico puede estar presente en diferentes formas, incluyendo, pero no limitadas a, como cristales, como microcristales, como nanocristales, como cocristales, como un pulverizado, como gránulos, como un polvo, como comprimidos, como un gel, como un concentrado soluble, como una emulsión, como un concentrado emulsionable, como una suspensión, como un concentrado en suspensión, como una emulsión en suspensión, como una dispersión, como un concentrado para dispersión, como una suspensión de microcápsulas o como cualquier otra forma o tipo de formulación agroquímica que está clara para los expertos en la técnica. Los productos agroquímicos no solo incluyen las sustancias o principios activos que están listos para el uso, sino también precursores en una forma inactiva, que se pueden activar mediante factores externos. Como un ejemplo no limitante, el precursor se puede activar por cambios de pH, provocados por heridas en las plantas después de un daño producido por un insecto, por una acción enzimática causada por un ataque de hongos, o por cambios de temperatura o cambios de la humedad.

"Parte de la planta", tal y como se emplea en esta memoria, significa cualquier parte de la planta, tanto como parte de una planta viva intacta o como material vegetal aislado o separado de una planta viva intacta, e incluso se puede concebir material vegetal muerto. Preferiblemente, dichas partes de la planta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos y tubérculos. Más preferiblemente, dichas partes de la planta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo y raíces. Incluso más preferiblemente, dicha planta es una planta viva intacta y/o dichas partes de la planta son partes de la planta de una planta viva intacta.

Con el fin de ser capaz de retener un producto agroquímico sobre una planta o una parte de la planta, o bien un agente de direccionamiento simple o bien múltiples agentes están fusionados o fijados con el producto agroquímico, ya sea a través de un enlace covalente, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, por fuerzas de Van der Waals débiles, o por cualquier combinación de los anteriores. "Fijado", tal y como se usa en la presente memoria, significa acoplado a, conectado a, anclado en, mezclado por adición con o que cubre.

En una realización preferida, dicho producto agroquímico se une a o está comprendido en un vehículo, como se definido anteriormente, mediante el cual el agente de direccionamiento está acoplado ya sea al vehículo o al producto agroquímico. Preferiblemente, el dominio de unión está acoplado al vehículo. "Acoplado", tal y como se emplea en esta memoria, puede ser cualquier acoplamiento que permite la retención del producto agroquímico o el vehículo que contiene el producto agroquímico mediante el agente de direccionamiento; puede ser una unión covalente, así como una unión no covalente. Preferiblemente, dicho acoplamiento es una unión covalente. Para una persona ex-

perta en la técnica, está claro cómo se pueden acoplar los dominios de unión y/o los agentes de direccionamiento a cualquier tipo de grupos funcionales presentes en la superficie externa de un vehículo. "Grupo funcional", tal y como se emplea en esta memoria, significa cualquier grupo químico al que se puede unir covalentemente una proteína, incluyendo pero no limitados a grupos carboxilo, amino, hidroxilo, sulfhidrilo o alquilo. Como ejemplo no limitativo, se puede aplicar el acoplamiento mediante la formación de un enlace carbodiimida entre grupos carboxilo en la superficie externa del vehículo y grupos amino del dominio de unión y/o del agente de direccionamiento. Los dominios de unión y/o los agentes de direccionamiento se pueden acoplar con el vehículo con o sin agentes de unión. En el caso de una célula microbiana o un fago, el agente de direccionamiento de acuerdo con la invención puede ser codificado por el genoma de la célula microbiana o el fago, mientras que el producto agroquímico está contenido o acoplado con la célula microbiana o el fago, ya sea como una proteína de fusión o por unión química. Un "agente enlazador", tal y como se emplea en esta memoria, puede ser cualquier agente enlazador conocido por el experto en la técnica; preferiblemente el agente enlazador está aumentando la flexibilidad del agente de direccionamiento unido sobre el vehículo, facilitando de este modo la unión del dominio de unión comprendido en el agente de direccionamiento con el sitio de unión en la planta. Ejemplos de tales agentes enlazadores se pueden encontrar en el documento WO0024884 y WO0140310.

Preferiblemente, dicho vehículo es un microvehículo. Un "microvehículo", tal y como se emplea en esta memoria, es un vehículo a base de partículas, en donde las partículas tienen un diámetro menor de 500 μm , preferiblemente menor de 250 μm , aún más preferible menor de 100 μm , lo más preferiblemente menor de 50 μm . Los microvehículos para la entrega de los productos agroquímicos son conocidos por la persona experta en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, nanocápsulas, microcápsulas, nanoesferas, microesferas, partículas de resina iónica débil, partículas de polímero, partículas de gel compuestas, partículas preparadas a partir de celulosa lignificada artificialmente, liposomas, vesículas y vehículos de administración de cocleatos. También es posible que uno o varios productos agroquímicos estén o bien presentes sobre o dentro de una célula microbiana (por ejemplo, una célula de levadura) o un fago (por ejemplo, porque uno o varios productos agroquímicos se pueden cargar dentro (o sobre) tales células o son productos biológicos que han sido producidos/expresados en dicha célula microbiana) o que uno o varios productos agroquímicos estén asociados (por ejemplo, unidos a o incrustados en) con fragmentos celulares (por ejemplo, fragmentos de paredes celulares o membranas celulares), fracciones celulares u otros residuos celulares (por ejemplo, obtenidos mediante fraccionamiento o lisis de las células microbianas en las que (o sobre las que) uno o varios productos agroquímicos se han cargado, producido o expresado) y que, por tanto, dichas células microbianas o fagos se utilizan como microvehículos. Tal y como se emplea en esta memoria, microvehículo, micropartícula, microesfera, microcápsula, nanopartícula, nanocápsula y nanoesfera se pueden utilizar indistintamente. Tales microvehículos se han descrito, entre otros, en los documentos US6180141, WO2004004453, WO2005102045 y US7494526. Preferiblemente, dicho microvehículo es una micropartícula compuesta por un polímero natural. Las características de los microvehículos pueden ser tales que permiten una liberación lenta del producto agroquímico, una liberación retardada del producto agroquímico o una liberación inmediata del producto agroquímico, todos los tipos de microvehículos tienen su uso específico. Los microvehículos pueden comprender naturalmente residuos reticulables que son adecuados para una fijación covalente o los microvehículos se pueden derivatizar para introducir grupos reticulables adecuados con métodos bien conocidos en la técnica. Esa derivatización puede ocurrir antes de la preparación del microvehículo, es decir, a nivel de las materias primas que se van a utilizar en dicho proceso de preparación, puede ocurrir durante el proceso de preparación del microvehículo o puede ocurrir con posterioridad a la preparación del microvehículo. En una realización específica, los grupos funcionales en el microvehículo se pueden unir a un agente enlazador o espaciador, el cual a su vez se une a un agente de direccionamiento como se ha definido anteriormente.

En otra realización preferida, uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen a un sitio de unión o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, presente en o sobre una o varias partes particulares de la planta, preferentemente la planta viva intacta. Preferiblemente, dichas partes de la planta, más preferiblemente de la planta viva intacta, se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos o tubérculos. Más preferiblemente, dichas partes de la planta, preferentemente la planta viva intacta, se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo o raíces. Más preferiblemente, uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen a un sitio de unión o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en la superficie de la planta, preferentemente la planta viva intacta. Preferiblemente, dicha superficie de la planta, preferentemente la planta viva intacta, es la superficie de una parte de la planta, preferentemente la planta viva intacta, seleccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la hoja, la superficie del tallo, la superficie de la raíz, la superficie del fruto, la superficie de la piña, la superficie de la flor, la superficie del bulbo o la superficie del tubérculo; incluso más preferiblemente dicha superficie de la planta, preferentemente la planta viva intacta, es la superficie de una parte de la planta, preferentemente la planta viva intacta, seleccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la raíz, la superficie del tallo y la superficie de la hoja.

En otra realización preferida, uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen al sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre una estructura particular de la planta, preferentemente la planta viva intacta, o en o sobre una estructura particular de una parte particular de la planta, preferentemente la planta viva intacta; más preferiblemente en o sobre una estructura particular implicada o involucrada en el transporte de nutrientes, productos agroquímicos u otros productos químicos en la planta y/o implicada o involucrada en la defensa de la planta. Preferiblemente, dicha estructura particular se selecciona a partir del

grupo que consiste en tricomas, estomas, lenticelas, pinchos, espinas, pelos de la raíz, cutícula y capa de cera, aún más preferiblemente dicha estructura particular se selecciona a partir del grupo que consiste en tricomas, estomas y cutícula. En una realización preferida, dichos uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen al sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los tricomas de la planta. En otra realización preferida, dichos uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen al sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los estomas. En aún otra realización preferida, dichos uno o varios dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen al sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre la cutícula de la planta.

En aún otra realización preferida, uno o varios dominios de unión de acuerdo con la presente descripción y comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen a goma arábiga. En otra realización preferida, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento, se unen a lectinas, dominios similares a lectina, extensinas o dominios similares a extensina; más preferiblemente, dicho dominio de unión se une a lectina de patata. Preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento comprenden 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contendrá al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad); más preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento se obtienen a partir de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento comprenden una secuencia de VHH. Todavía incluso más preferiblemente, dicho VHH comprende dos puentes disulfuro. Más preferiblemente, dicho VHH comprende, preferiblemente consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 - SEQ ID N°42 (3A2, 3B4, 3B7, 3D10, 3D2, 3D8, 3E6, 3F5, 3F7, 3F9, 3G2, 3G4, 3H10, 3H8, 4A1, 5B5, 5B6, 5C4, 5C5, 5D4, 5E5, 5F5, 5G2, 5G5, 5H5, 7A2, 7C2, 7D2, 7E1_1, 7F1, 8B10, 8B12, 9A1, 9B5, 9C4, 9D5, 9E1, 9E4, 9F4, 9H1, 9H2 y 12H4), o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contendrá al menos alguno de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad) u homólogos de las mismas.

Un tercer aspecto de la presente descripción es el uso de un agente de direccionamiento de acuerdo con la invención para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en una planta o una parte de la planta.

Cualquier parte de la planta, tanto si es una parte de una planta viva intacta o si está aislada o separada de una planta viva intacta, e incluso el material vegetal muerto se puede contemplar como una diana para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, utilizando un agente de direccionamiento de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dichas partes de la planta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos y tubérculos. Más preferiblemente, dichas partes de la planta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallo y raíces. Incluso más preferiblemente, dicha planta es una planta viva intacta y/o dichas partes de la planta son partes de la planta de una planta viva intacta. Dicha administración se lleva a cabo usando cualquier técnica manual o mecánica adecuada o deseada para la aplicación de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, incluyendo, pero no limitada a la pulverización, cepillado, vendado, goteo, recubrimiento, inmersión, extensión, aplicación como pequeñas gotitas, una niebla o un aerosol. Como ejemplos no limitantes, un agente de direccionamiento de acuerdo con la invención se puede usar para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en las hojas de un cultivo que crece en el campo, se puede utilizar para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en las raíces de un cultivo propagado mediante hidroculivo, se puede utilizar para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en partes de plantas cosechadas (por ejemplo, frutos, flores o semillas) como un tratamiento posterior a la cosecha, se puede utilizar para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en un material vegetal vivo o muerto presente en el suelo después de la preparación de tierra cultivable, que es particularmente útil en combinación con las prácticas agrícolas de siembra directa, o se puede usar para administrar y retener un producto agroquímico en un sustrato colocado en la proximidad de una rizosfera para lograr una distribución y una retención prolongada de los productos agroquímicos en toda la rizosfera. Un aspecto particularmente ventajoso de la invención es que permite, eligiendo adecuadamente la combinación de agente de direccionamiento y producto agroquímico, o la combinación de productos agroquímicos para formular la misma sustancia activa para una variedad de usos diferentes, por ejemplo, en diferentes especies vegetales o partes de plantas, para diferentes condiciones ambientales (tipo de suelo, cantidad de lluvia y otras condiciones climáticas, o incluso diferentes condiciones estacionales) y diferentes usos finales (por ejemplo en el campo, en invernaderos, en jardines, en sistemas de cultivo hidropónico, para un posible uso de liberación rápida, retrasada o lenta dependiente del entorno, para uso doméstico y para uso a través de operadores de control de plagas). Por tanto, mediante el uso del agente de direccionamiento para administrar y retener el producto agroquímico, es posible, partiendo de sustancias agroquímicas o formulaciones agroquímicas activas con probada eficacia, que sean ambientalmente aceptables, para proporcionar una gama de productos o agentes de protección de plantas diferentes y mejorados u otros productos agroquímicos que se adaptan para el uso final deseado o previsto. Como un ejemplo no limitativo, se puede preparar un herbicida de amplio espectro de modo que sea específico de una especie vegetal mediante la administración del mismo utilizando un agente de direccionamiento que comprende un dominio de unión específico de la especie vegetal; por otra

parte, la administración del mismo herbicida usando un agente de direccionamiento que comprende un dominio de unión que tiene una especificidad de espectro amplio, puede ayudar a reducir las cantidades de herbicida necesarias para ejercer su acción deseada. Además, se puede evitar una actividad no deseada que no sea el objetivo de un producto agroquímico, por ejemplo, frente a insectos beneficiosos, mediante la administración del producto agroquímico usando un agente de direccionamiento que comprenda un dominio de unión que sea altamente específico para el cultivo diana o para partes específicas del cultivo diana.

Preferiblemente, dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos se selecciona a partir de los grupos que consisten en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes y compuestos reguladores del crecimiento de las plantas.

Preferiblemente, dicho método de administración y retención de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos da lugar a una mejora del depósito de dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos en la planta o una parte de la planta. "Depósito mejorado", tal y como se usa en el presente documento, significa que o bien la cantidad de producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos que se une a la planta o la parte de la planta se incrementa y/o que la distribución del producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos se divide sobre la planta o parte de planta, ya sea más homogéneamente o de forma más concentrada, en función de la especificidad del dominio de unión comprendido en el agente de direccionamiento, cuando se compara con el mismo producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos aplicados sin el uso de ningún agente de direccionamiento.

En una realización preferida, dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos se une o está comprendido en un vehículo, preferiblemente un microvehículo como se ha definido anteriormente. Esto puede ser por ejemplo particularmente ventajoso para un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos que son volátiles o que se degradan rápidamente por factores ambientales tales como la presencia de humedad o radiación UV, o que presenta un riesgo de toxicidad considerable para la persona que maneja el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos. En una realización específica, los grupos funcionales en el vehículo pueden estar unidos a un agente enlazador o espaciador, que a su vez está unido a un agente de direccionamiento como se ha definido anteriormente.

Un cuarto aspecto de la presente descripción es una composición, que comprende al menos (i) un agente de direccionamiento que comprende al menos un dominio de unión de acuerdo con la invención y (ii) un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos.

El o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición pueden ser o bien un agente de direccionamiento "monoespecífico" o un agente de direccionamiento "multiespecífico". Por agente de direccionamiento "monoespecífico" se entiende un agente de direccionamiento que comprende o bien un único dominio de unión, o que comprende dos o más dominios de unión diferentes en donde cada uno está dirigido contra el mismo antígeno presente junto a o en el mismo sitio de unión o que forma dicho sitio de unión. Por lo tanto, un agente de direccionamiento monoespecífico es capaz de unirse a un solo sitio de unión, ya sea a través de un único dominio de unión o a través de múltiples dominios de unión. Por agente de direccionamiento "multiespecífico" se entiende un agente de direccionamiento que comprende dos o más dominios de unión, en donde cada uno está dirigido contra antígenos diferentes presentes junto a o en un sitio de unión o que forman dicho sitio de unión. Por tanto, un agente de direccionamiento "bienespecífico" es capaz de unirse a dos sitios de unión o antígenos diferentes presentes junto a o en un sitio de unión o que forman dicho sitio de unión; un agente de direccionamiento "triespecífico" es capaz de unirse a tres antígenos diferentes presentes junto a o en un sitio de unión o que forman dicho sitio de unión; y así sucesivamente para los agentes de direccionamiento "multiespecíficos". También, con respecto a los agentes de direccionamiento descritos en este documento, el término "monovalente" se utiliza para indicar que el agente de direccionamiento comprende un único dominio de unión; el término "bivalente" se utiliza para indicar que el agente de direccionamiento comprende un total de dos dominios de unión individuales; el término "trivalente" se utiliza para indicar que el agente de direccionamiento comprende un total de tres dominios de unión individuales; y así sucesivamente para agentes de direccionamiento "multivalentes". Por consiguiente, en un aspecto, la composición anterior de la presente descripción comprende dos o más agentes de direccionamiento idénticos o diferentes, con lo que se entiende dos o más agentes de direccionamiento, que para los agentes de direccionamiento idénticos, cada uno se une a antígenos idénticos o diferentes presentes junto a o en el mismo sitio de unión, mientras que para los agentes de direccionamiento diferentes, al menos uno se une a antígenos diferentes presentes junto a o en el mismo sitio de unión o en sitios de unión diferentes.

Preferiblemente, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, presente en o sobre una o varias partes particulares de una planta, preferiblemente de una planta viva intacta. Preferiblemente, dichas partes de la planta, más preferiblemente de la planta viva intacta, se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallos, raíces, frutos, piñas, flores, bulbos o tubérculos. Más preferiblemente, dichas partes de la planta viva intacta se seleccionan a partir del grupo que consiste en hojas, tallos o raíces. Más preferiblemente, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en la superficie de la planta viva intacta. Preferiblemente, dicha superficie de la planta viva intacta es la superficie de una parte de la planta viva intacta, se-

leccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la hoja, la superficie del tallo, la superficie de la raíz, la superficie del fruto, la superficie de la piña, la superficie de la flor, la superficie del bulbo o la superficie del tubérculo; incluso más preferiblemente dicha superficie de la planta viva intacta es la superficie de una parte de la planta viva intacta, seleccionada a partir del grupo que consiste en la superficie de la raíz, la superficie del tallo y la superficie de la hoja.

Preferiblemente, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre una estructura particular de la planta, preferentemente la planta viva intacta o en o sobre una estructura particular de una parte particular de la planta, preferentemente la planta viva intacta; más preferiblemente en o sobre una estructura particular implicada o involucrada en el transporte de nutrientes, productos agroquímicos u otros productos químicos dentro de la planta y/o implicada o involucrada en la defensa de la planta. Preferiblemente, dicha estructura particular se selecciona a partir del grupo que consiste en tricomas, estomas, lenticelas, pinchos, espinas, pelos de la raíz, cutícula y capa de cera, aún más preferiblemente dicha estructura particular se selecciona a partir del grupo que consiste en tricomas, estomas y cutícula. En una realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los tricomas de la planta. En otra realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre los estomas. En aún otra realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a un sitio de unión, o a un antígeno comprendido en tal sitio de unión, en o sobre la cutícula de la planta.

En aún otra realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a la goma arábiga. En otra realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que se une a lectinas, dominios similares a lectina, extensinas o dominios similares a extensina; más preferiblemente, dicho dominio de unión se une a la lectina de la patata. Preferiblemente, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contienen al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad); más preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento se obtiene a partir de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferiblemente uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento comprenden una secuencia de VHH. Todavía incluso más preferiblemente, dicho VHH comprende dos puentes disulfuro. Lo más preferiblemente, dicho VHH comprende, preferiblemente consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 - SEQ ID N°42 (3A2, 3B4, 3B7, 3D10, 3D2, 3D8, 3E6, 3F5, 3F7, 3F9, 3G2, 3G4, 3H10, 3H8, 4A1, 5B5, 5B6, 5C4, 5C5, 5D4, 5E5, 5F5, 5G2, 5G5, 5H5, 7A2, 7C2, 7D2, 7E1_1, 7F1, 8B10, 8B12, 9A1, 9B5, 9C4, 9D5, 9E1, 9E4, 9F4, 9H1, 9H2 y 12H4), o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contiene al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad) u homólogos de las mismas.

En la composición de acuerdo con la presente descripción, dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes o compuestos que regulan el crecimiento de las plantas.

En la composición de acuerdo con la presente descripción, el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos puede estar en forma líquida, semisólida o sólida y, por ejemplo, estar conservada como un aerosol, polvo fluido, polvo humectable, gránulo humectable, concentrado emulsionable, concentrado en suspensión, microemulsión, suspensión en cápsula, microcápsula seca, comprimido o gel, o estar suspendida, dispersada, emulsionada o preparada de otro modo en un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico u oleoso adecuado) para el almacenamiento o la aplicación sobre una planta. Opcionalmente, la composición comprende además uno o varios componentes adicionales tales como, pero no limitados a, diluyentes, disolventes, adyuvantes, agentes tensioactivos, agentes humectantes, agentes dispersantes, aceites, adhesivos, espesantes, penetrantes, agentes tamponantes, acidificantes, agentes antisedimentación, agentes anticongelantes, fotoprotectores, agentes desespumantes, biocidas y/o agentes de control de la deriva o similares, adecuados para uso en la composición de acuerdo con la presente descripción.

En una realización preferida, el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos se une a o está comprendida de otro modo en un vehículo. En el caso de una combinación de productos agroquímicos, cada producto agroquímico individual puede estar unido o estar comprendido de otro modo en un vehículo individual, o una combinación adecuada de productos agroquímicos se puede unir de forma conjunta o estar comprendida de otro modo en un vehículo. Como alternativa a la utilización de un vehículo, el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos también se puede proporcionar en forma de partículas (pequeñas) que están provistas de un recubrimiento adecuado o capa (exterior) sobre el que se acopla o se puede unir el agente de direccionamiento y que puede servir también para estabilizar o mejorar la integridad física o la estabilidad de las partículas. Como otra

alternativa, el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos se puede mezclar adecuadamente con un excipiente o aglutinante al que se acopla o se puede unir el agente de direccionamiento y que puede servir de nuevo también para estabilizar o mejorar la integridad física o la estabilidad de las partículas. Tales partículas recubiertas o compuestas están preferiblemente en forma de una suspensión, una torta húmeda o un polvo de fluido libre, un comprimido, una cápsula o un concentrado líquido (tal como una emulsión, suspensión o dispersión).

En una realización preferida, la composición de acuerdo con la presente descripción es para uso agroquímico. El "uso agroquímico", tal y como se usa en el presente documento, no solo incluye el uso de productos agroquímicos como se han definido anteriormente (por ejemplo, pesticidas, reguladores del crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, desfoliantes etc.) que son adecuados y/o están destinados a un uso en cultivos que crecen en el campo (por ejemplo, agricultura), sino que también incluye el uso de productos agroquímicos como se han definido anteriormente (por ejemplo, pesticidas, reguladores del crecimiento, nutrientes/fertilizantes, repelentes, desfoliantes, etc.) que están destinados para uso en cultivos de invernadero (por ejemplo, horticultura/floricultura) o sistemas de cultivo hidropónico e incluso el uso de productos agroquímicos como se han definido anteriormente que son adecuados y/o están destinados a usos que no sean de cultivo, tales como usos en jardines privados, usos domésticos (por ejemplo, herbicidas o insecticidas para uso doméstico), o usos como operadores de control de plagas (por ejemplo, control de malas hierbas, etc.).

Basándose en las enseñanzas que figuran en la presente memoria descriptiva y, por ejemplo, en función del o de los productos agroquímicos que se van a administrar, en la o las partes de la planta en la que se va a administrar el o los productos agroquímicos, y la acción agroquímica destinada de la composición de la presente descripción (y/o del o de los productos agroquímicos incluidos en la misma), el experto en la materia será capaz de seleccionar adecuadamente los dominios de unión específicos/agente de direccionamiento que puede/debe estar presente en la composición de la presente descripción (así como los otros componentes de la composición, tales como el vehículo, el producto agroquímico y la forma/formulación agroquímica) con el fin de conseguir la acción agroquímica deseada/prevista. Por lo tanto, con ventaja, basándose en la presente descripción, la presente descripción hace posible que la persona experta seleccione adecuadamente una combinación adecuada de dominio(s) de unión/agente(s) de direccionamiento, producto(s) agroquímico(s), vehículo, otros componentes de la composición y la forma/formulación agroquímica de la composición con el fin de conseguir la acción agroquímica destinada/deseada. A este respecto, cabe señalar que, en la presente descripción tal y como se contempla en la actualidad y aunque se prevé que algunas de tales combinaciones sean más eficaces y/o más preferidas que otras, es probable que haya múltiples combinaciones posibles de ese tipo que proporcionarán la acción agroquímica destinada/deseada en más o menos el mismo grado. Esto también permite que el experto en la materia tenga en cuenta otros factores (secundarios) cuando se selecciona la combinación que se va a utilizar, tales como el o los cultivos específicos que se van a proteger, el campo prevalente, el suelo, el clima y/u otras condiciones ambientales, la manera en que la composición se aplica preferentemente, el medio ambiente en el que se aplica (campo, invernadero, etc.), la persistencia deseada y/u otros factores que pueden influir en la elección de una composición agroquímica para una aplicación específica.

Por ejemplo y sin limitación, cuando la composición de la presente descripción se pretende unir con una o varias partes de la planta, el agente de direccionamiento (es decir, uno o varios dominios de unión presentes en el mismo) se dirigen preferentemente a uno o más sitios de unión (como se han definido en este documento) que están presentes (es decir, en una cantidad suficiente) en/sobre dicha o dichas partes de la planta (también es posible que tal sitio o sitios de unión estén presentes en dicha o dichas partes de la planta en una mayor cantidad/hasta en un mayor grado que en otras partes de la planta, es decir, con el fin de proporcionar un dominio de unión/agente de direccionamiento/composición de la presente descripción que se pueda unir preferentemente a la o las partes de la planta previstas/deseadas, en comparación con una o varias otras partes de la planta); y las composiciones de la presente descripción que comprenden tales dominios de unión/agentes de direccionamiento (es decir, de modo que las composiciones están dirigidas hacia los sitios de unión presentes en la o las partes deseadas de la planta y, preferentemente, de tal manera que pueden unirse preferentemente a la o las partes deseadas de la planta) forman algunos aspectos específicos pero no limitativos de la presente descripción. Por ejemplo y sin limitación:

- para una composición de la presente descripción que está destinada a unirse a las hojas de una planta, los dominios de unión y/o el agente de direccionamiento se pueden dirigir contra uno o varios de los siguientes sitios de unión en (las hojas de) una planta: cutina, ceras cuticulares, proteínas de arabinogalactano o proteínas de transferencia de lípidos;
- para una composición de la presente descripción que está destinada a unirse a las raíces de una planta los dominios de unión y/o el agente de direccionamiento se pueden dirigir contra uno o varios de los siguientes sitios de unión en (las raíces de) una planta: extensinas o pectinas;
- para una composición de la presente descripción que está destinada a unirse al tallo de una planta, los dominios de unión y/o el agente de direccionamiento se pueden dirigir contra uno o varios de los siguientes sitios de unión en (el tallo de) una planta: ligninas, extensinas o productos de excreción;

y cada una de esas composiciones de la presente descripción forma un aspecto específico, pero no limitativo de la presente descripción.

Un quinto aspecto de la presente descripción es una composición, que comprende al menos (i) un agente de direccionamiento que comprende al menos un dominio de unión de acuerdo con la presente descripción y (ii) un vehículo.

El o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición pueden ser o bien agentes de direccionamiento monoespecíficos o agentes de direccionamiento multiespecíficos y pueden ser o bien agentes de direccionamiento monovalentes o agentes de direccionamiento multivalentes. Por consiguiente, en un aspecto, la composición anterior de la presente descripción comprende dos o más agentes de direccionamiento idénticos o diferentes, con lo que se entiende dos o más agentes de direccionamiento que, para agentes de direccionamiento idénticos, cada uno se une a antígenos idénticos o diferentes presentes junto a o en el mismo sitio de unión, mientras que para agentes de direccionamiento diferentes, al menos uno se une a diferentes antígenos presentes junto a o en el mismo sitio de unión o en diferentes sitios de unión.

En una realización específica, que se prefiere, pero no es limitativa, el vehículo es tal que permite que la composición de la presente descripción se aplique adecuadamente en el sitio de acción deseado, y/o de tal manera que permita que la composición de la presente descripción se formule de modo que se pueda aplicar convenientemente en el sitio de acción pretendido; utilizando cualquier técnica manual o mecánica adecuada o deseada tal como pulverización, cepillado, goteo, inmersión, recubrimiento, difusión, aplicando pequeñas gotitas, una niebla o un aerosol, etc. Ejemplos de tales técnicas, de composiciones de la presente descripción que son adecuadas para uso en tales técnicas y de métodos para la preparación y la formulación de tales composiciones de la presente descripción, serán evidentes para el experto en la materia basándose en la presente descripción. Preferiblemente, el vehículo es tal que una o varias sustancias activas se pueden incorporar, encapsular o incluir en el vehículo, por ejemplo, como una nanocápsula, microcápsula, nanoesfera, microesfera, liposoma o vesícula. Incluso más preferiblemente, el vehículo es tal que a partir de tal incorporación, encapsulación, incrustación o inclusión, el complejo así obtenido se puede suspender, dispersar, emulsionar o llevar de otra manera a un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico u oleoso adecuado) con el fin de proporcionar una composición líquida (concentrada) de la presente descripción que tiene una estabilidad que permite que la composición de la presente descripción se almacene adecuadamente o (en caso necesario después de una dilución adicional) se aplique en el sitio de acción pretendido. Aún más preferiblemente, el vehículo es tal que la composición de la presente descripción se puede transportar y/o almacenar antes del uso final, opcionalmente (y usualmente preferiblemente) como un concentrado adecuado líquido, polvo seco, comprimido, cápsula, suspensión o "torta húmeda", que se puede diluir, dispersar, suspender, emulsionar o reconstituir adecuadamente de otra manera adecuada por medio del usuario final antes de su uso final (y tales concentrados forman un aspecto adicional de la presente descripción). Los vehículos, preferiblemente microvehículos, adecuados para este propósito (y los métodos para la absorción, encapsulación, incrustación, etc. de los principios activos en los mismos) serán evidentes para la persona experta, basándose en la descripción en el presente documento y/o pueden estar disponibles comercialmente. Algunos ejemplos no limitativos incluyen microesferas o granulados sólidos o semisólidos en los que los ingredientes activos se incrustan o se absorben en un material de matriz adecuado o microcápsulas que comprenden un material de recubrimiento que rodea un núcleo que contiene el ingrediente activo (es decir, encapsulado dentro de la microcápsula).

Preferiblemente, los vehículos son de tal modo que tienen características de liberación inmediata, retardada, gradual, provocada o lenta, por ejemplo, durante varios minutos, varias horas, varios días o varias semanas. Además, los vehículos pueden estar hechos a base de materiales (por ejemplo polímeros) que se rompen o se degradan lentamente (por ejemplo, debido a una exposición prolongada a temperatura alta o baja, pH alto o bajo, luz del sol, humedad alta o baja u otros factores o condiciones ambientales) con el tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días o semanas) o que se rompen o degradan cuando son activados por determinados factores externos (tales como temperatura alta o baja, pH alto o bajo, humedad alta o baja u otros factores o condiciones ambientales) y así liberan el agente activo desde la microcápsula. El vehículo también es preferiblemente tal que los productos agroquímicos son liberados desde el vehículo cuando la composición de la presente descripción se aplica en el sitio previsto de la acción, es decir, con una tasa que es suficiente para proporcionar la acción deseada de los productos agroquímicos durante el período de tiempo deseado (por ejemplo, el tiempo entre dos aplicaciones de la composición de la presente descripción).

En una realización particular, el vehículo, el microvehículo preferiblemente puede estar compuesto a base de materiales poliméricos, tales como por ejemplo poliuretano, poliurea, poliamida, polietileno, polietilenglicol, poli(alcoholes vinílicos), melamina, urea/formaldehído, polímeros acrílicos, nailon, acetato de vinilo o polímeros de siloxano o - opcionalmente (y por lo general preferentemente) para fines agroquímicos - polímeros biodegradables (tales como por ejemplo, agar, gelatina, alginatos, gomas, pectinas, polialcoholes tales como alcohol cetílico, sustancias oleosas tales como aceite de palma hidrogenado o aceite de soja, almidones, ceras, etc. Alternativamente y aunque esto es generalmente menos preferido, se pueden utilizar materiales no biodegradables, tales como polimetacrilatos, polietersulfonas, óxidos metálicos, estructuras de carbono, etc.

Preferiblemente, dicho vehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en nanocápsulas, nanoesferas, microcápsulas, microesferas, partículas de polímero, partículas preparadas a base de celulosa lignificada artificialmente, partículas de gel compuestas, partículas de resina iónica débil, células microbianas o fragmentos de las mismas. Más preferiblemente, dicho vehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en microcápsulas, microesferas o partículas de polímero. Más preferiblemente, dicho vehículo es una microcápsula.

En una realización preferida, el o los agentes de direccionamiento comprendidos en dicha composición, comprenden al menos un dominio de unión que comprende 4 regiones estructurales y 3 regiones determinantes de complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contiene al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad); más preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento se obtiene a partir de un anticuerpo de camélido de cadena pesada, incluso más preferiblemente, uno o varios de dichos dominios de unión comprendidos en el agente de direccionamiento comprenden una secuencia de VHH. Todavía incluso más preferiblemente, dicho VHH comprende dos puentes disulfuro. Más preferiblemente, dicho VHH comprende, preferiblemente consiste en una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 - SEQ ID N°42 (3A2, 3B4, 3B7, 3D10, 3D2, 3D8, 3E6, 3F5, 3F7, 3F9, 3G2, 3G4, 3H10, 3H8, 4A1, 5B5, 5B6, 5C4, 5C5, 5D4, 5E5, 5F5, 5G2, 5G5, 5H5, 7A2, 7C2, 7D2, 7E1_1, 7F1, 8B10, 8B12, 9A1, 9B5, 9C4, 9D5, 9E1, 9E4, 9F4, 9H1, 9H2 y 12H4), o cualquier fragmento adecuado de las mismas (que entonces por lo general contiene al menos alguno de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de complementariedad) u homólogos de las mismas.

En otra realización preferida, el agente de direccionamiento y el vehículo comprendido en la composición de acuerdo con la presente descripción, se acoplan entre sí. Preferiblemente, dicho agente de direccionamiento único o agentes de direccionamiento múltiples están acoplados con dicho vehículo mediante unión por afinidad o por unión covalente. Más preferiblemente dicho agente de direccionamiento único o agentes de direccionamiento múltiples, están acoplados con el vehículo mediante unión covalente. Preferiblemente, dicho agente de direccionamiento único o agentes de direccionamiento múltiples se acoplan, preferiblemente se acoplan covalentemente, con el vehículo mediante el uso de un grupo funcional presente en la superficie exterior del vehículo. Preferiblemente, el dominio de unión comprendido en dicho o dichos agentes de direccionamiento está acoplado, preferiblemente acoplado covalentemente, con el vehículo. Alternativamente, dicho agente de direccionamiento único o agentes de direccionamiento múltiples están acoplados, preferentemente acoplados covalentemente, con el vehículo a través de un resto que no es el dominio de unión comprendido en el agente de direccionamiento.

En aún otra realización preferida, dicho vehículo está acoplado y/o comprende al menos un producto agroquímico como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, dicho producto agroquímico se selecciona a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, micronutrientes, protectores o compuestos reguladores del crecimiento de las plantas. En esta realización preferida, dicha composición es para uso agroquímico.

El vehículo con uno o varios agentes de direccionamiento unidos, acoplados o unidos de otro modo al mismo, o asociados con el mismo, puede estar disuelto, emulsionado, suspendido o dispersado o incluido de otra manera, en un medio líquido adecuado (tal como agua u otro medio acuoso, orgánico u oleoso) a fin de proporcionar una solución, suspensión, dispersión o emulsión (concentrada) que es adecuada para el almacenamiento.

Por ejemplo, cuando la composición de la presente descripción es para uso agroquímico, la composición de la presente descripción puede estar en una forma líquida, semisólida o sólida que es adecuada para la pulverización, tal como una solución, emulsión, suspensión, dispersión, aerosol, polvo fluido o cualquier otra forma adecuada. En particular, una composición de ese tipo de la presente descripción para uso agroquímico puede comprender una microcápsula, microesfera, nanocápsula, nanoesfera, liposomas o vesículas, etc., en donde uno o varios productos agroquímicos están adecuadamente encapsulados, incluidos, incrustados, incorporados o incluidos de otro modo; y uno o varios agentes de direccionamiento los cuales comprenden cada uno, uno o varios dominios de unión para unirse a uno o varios antígenos presentes junto a o en dicho sitio de unión o que forman dichos uno o varios sitios de unión en una planta o partes de una planta, tal como una hoja, tallo, flor, fruto, bulbo o tubérculo de una planta).

Un sexto aspecto de la presente descripción es un método para administrar un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos a una planta, comprendiendo dicho método al menos una aplicación de una composición de acuerdo con la presente descripción a la planta.

"Una aplicación", tal y como se emplea en esta memoria, significa un único tratamiento de una planta o de parte de una planta. De acuerdo con este método, o bien la composición de acuerdo con la presente descripción se aplica como tal a la planta o la parte de planta, o dicha composición se disuelve primero, se suspende y/o se diluye en una solución adecuada antes de ser aplicada a la planta. La aplicación a la planta se lleva a cabo usando cualquier técnica manual o mecánica adecuada o deseada para la aplicación de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, incluyendo, pero no limitadas a, pulverización, cepillado, vendaje, goteo, inmersión, recubrimiento, difusión, aplicación de gotitas pequeña, una niebla o un aerosol. Después de esa aplicación a una planta o a una parte de una planta, la composición se puede unir junto al sitio de unión o en el mismo (o a uno o varios antígenos presentes junto a o en dicho sitio de unión o que forman dicho sitio de unión) a través de uno o varios dominios de unión que forman parte del o de los agentes de direccionamiento comprendidos en la composición, preferiblemente de una manera dirigida. Acto seguido, los productos agroquímicos son liberados desde el vehículo (por ejemplo, debido a la degradación del vehículo o por transporte pasivo a través de la pared del vehículo) de tal manera que pueden proporcionar la o las acciones agroquímicas deseadas. Una ventaja particular de administrar un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos a una planta usando una composición de acuerdo con la presente descripción, es que puede conducir a una mejora del depósito (como se ha definido ante-

riormente) del producto agroquímico o de una combinación de productos agroquímicos sobre la planta o una parte de la planta, y/o una mayor resistencia del producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos frente a una pérdida debido a factores externos como la lluvia, riego, nieve, granizo o viento.

- En una realización preferida, la administración de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos a una planta usando una composición de acuerdo con la presente descripción da lugar a una mejora de la resistencia a la lluvia del producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos. "Mejora de la resistencia a la lluvia", tal y como se emplea en esta memoria, significa que el porcentaje de pérdida de producto agroquímico o de combinación de productos agroquímicos, calculado antes y después de la lluvia, es más bajo cuando se aplica el producto agroquímico o la combinación de productos agroquímicos en una composición de acuerdo con la presente descripción, en comparación con el mismo producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos comprendidos en una composición comparable, sin ningún agente de direccionamiento. Una "composición comparable", tal y como se emplea en esta memoria, significa que la composición es idéntica a la composición de acuerdo con la presente descripción, aparte de la ausencia del agente de direccionamiento empleado en la composición de acuerdo con la presente descripción.
- En una realización preferida, una dosis adecuada de dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos comprendidos en una composición de acuerdo con la presente descripción, se aplica a la planta o a una parte de la planta. Una "dosis adecuada", tal y como se emplea en esta memoria, significa una cantidad eficaz de la sustancia activa del producto agroquímico comprendido en dicha composición.

- Preferiblemente, dicho método comprende la aplicación de una dosis significativamente reducida de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos a la planta, para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico o combinación de dichos productos agroquímicos, en comparación con la aplicación del mismo producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos comprendidos en una composición comparable, como se ha definido anteriormente, sin ningún agente de direccionamiento. Dicha reducción significativa se obtiene dirigiendo dicho producto agroquímico a la planta usando agentes de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción. Alternativamente, dicho método comprende la aplicación de una dosis adecuada, por lo que la frecuencia de la aplicación se reduce de manera significativa, para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico, en comparación con la frecuencia de la aplicación de la misma dosis de una composición encapsulada del producto agroquímico que carece de la presencia de un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción. Incluso más preferiblemente, dicho método comprende una aplicación en la que la dosis adecuada, así como la frecuencia de la aplicación, ambas están significativamente reducidas para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico, en comparación con la dosis adecuada y la frecuencia de la aplicación de una composición encapsulada del producto agroquímico que carece de la presencia de un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción.

- Un séptimo aspecto de la presente descripción es un método para proteger una planta frente al estrés externo (biótico o abiótico) y/o para modular la viabilidad, el crecimiento o el rendimiento de una planta o partes de una planta y/o para modular la expresión génica en una planta o una parte de la planta que da lugar a una alteración de (los niveles de) componentes de la planta (tales como proteínas, aceites, hidratos de carbono, metabolitos, etc.), comprendiendo dicho método al menos una aplicación de una composición de acuerdo con la presente descripción. Si es necesario, dicha composición se disuelve, se suspende y/o se diluye en una solución adecuada. La "protección de una planta", tal y como se emplea en esta memoria, es la protección de la planta frente al estrés; dicho estrés puede ser estrés biótico, tal como, pero no limitado a estrés causado por malas hierbas, insectos, roedores, nematodos, ácaros, hongos, virus o bacterias, o puede ser estrés abiótico, tal como pero no limitado a estrés hídrico, estrés salino, estrés por temperatura o estrés oxidativo.

- Preferiblemente, dicho método comprende la aplicación de una dosis significativamente reducida de un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos a la planta, para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico o combinación de dichos productos agroquímicos, en comparación con la aplicación del mismo producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos comprendidos en una composición comparable, tal como se ha definido anteriormente, sin ningún agente de direccionamiento. Dicha reducción significativa se obtiene dirigiendo dicho producto agroquímico a la planta usando agentes de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción. Alternativamente, dicho método comprende una aplicación de una dosis adecuada, por lo que la frecuencia de la aplicación se reduce de manera significativa, para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico, en comparación con la frecuencia de la aplicación de la misma dosis de una composición encapsulada del producto agroquímico que carece de la presencia de un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción. Incluso más preferiblemente, dicho método comprende una aplicación en la que la dosis adecuada, así como la frecuencia de la aplicación, ambas están significativamente reducidas para obtener efectos beneficiosos similares para dicho producto agroquímico, en comparación con la dosis adecuada y la frecuencia de la aplicación de un producto agroquímico encapsulado que carece de la presencia de un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción.

- Un octavo aspecto de la presente descripción es un método para preparar un vehículo agroquímico dirigido específicamente, que comprende (a) envasar un producto agroquímico en o sobre (a) un vehículo y (b) fijar al menos un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción en el vehículo.

"Envasar", tal y como se usa en el presente documento, significa incorporar, incluir, inmovilizar, adsorber, absorber, unir, encapsular, incrustar, fijar, mezclar por adición, anclar o comprender. Métodos para envasar un producto agroquímico, tal y como se ha definido anteriormente, en o sobre un vehículo son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, sin limitación, goteo a presión, granulación por extrusión, granulación en lecho fluido, coextrusión, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización, atomización, polimerización por adición o condensación, polimerización interfacial, polimerización in situ, coacervación, encapsulación por pulverización, dispersiones fundidas enfriadas, evaporación de disolvente, separación de fases, extracción con disolvente, polimerización sol-gel, mezclado con cizallamiento alto o bajo, recubrimiento en lecho fluido, recubrimiento en bandeja, fusión, absorción pasiva o activa o adsorción. En una realización preferida, pero no limitante, un producto agroquímico se envasa en un microvehículo usando técnicas de microencapsulación adecuadas, tales como polimerización interfacial, polimerización in situ, coacervación, encapsulación por pulverización, dispersiones fundidas enfriadas, evaporación del disolvente, separación de fases, extracción con disolvente o polimerización sol-gel. Ejemplos preferidos de materiales adecuados pero no limitantes, para producir tales microvehículos son tales como alginatos, agar, gelatina, pectinas, gomas, aceites hidrogenados, almidones, ceras, polialcoholes, poliurea, poliuretano, poliamida, melamina, urea/formaldehído, nailon y otros polímeros (opcional y generalmente se prefieren biodegradables o inertes). Más preferiblemente, al menos un grupo funcional está presente en la superficie exterior del microvehículo.

Al menos un agente de direccionamiento de acuerdo con la invención está fijado al vehículo, ya sea por un enlace covalente, por enlaces de hidrógeno, por interacciones dipolo-dipolo, por fuerzas débiles de Van der Waals o por una combinación de cualquiera de los anteriores. La fijación del agente de direccionamiento con el vehículo se puede realizar mientras que se envasa el producto agroquímico en o sobre el vehículo, se puede llevar a cabo después de envasar el producto agroquímico en o sobre el vehículo o se puede realizar solamente en el momento en el que el vehículo que contiene el producto agroquímico se disuelve en una solución adecuada para la aplicación. Los procedimientos adecuados para la fijación de dicho agente de direccionamiento a un vehículo estarán claros para la persona experta en la técnica. En una realización preferida, el agente de direccionamiento y el vehículo están acoplados entre sí. Preferiblemente, dicho o dichos agentes de direccionamiento están acoplados a dicho vehículo mediante unión por afinidad o por unión covalente. Más preferiblemente, dicho o dichos agentes de direccionamiento están acoplados al vehículo por unión covalente. Preferiblemente, dicho o dichos agentes de direccionamiento están acoplados, preferiblemente acoplados covalentemente, con el vehículo mediante el uso de un grupo funcional presente en la superficie exterior del vehículo. Preferiblemente, el dominio de unión comprendido en dicho o dichos agentes de direccionamiento está acoplado, preferiblemente acoplado covalentemente, al vehículo. Alternativamente, dicho o dichos agentes de direccionamiento están acoplados, preferiblemente acoplados covalentemente, con el vehículo a través de un resto que no es el dominio de unión comprendido en el agente de direccionamiento. En una realización preferida, dicho procedimiento para fijar dicho o dichos agentes de direccionamiento a un vehículo comprende (a) hacer reaccionar un agente enlazador con un vehículo y (b) hacer reaccionar al menos un agente de direccionamiento con dicho agente enlazador.

Un noveno aspecto de la presente descripción es un procedimiento para fijar un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción a un vehículo, que comprende (a) hacer reaccionar un agente enlazador con un vehículo y (b) hacer reaccionar dicho agente de direccionamiento con dicho agente enlazador. "Reaccionar", tal y como se usa en el presente documento, significa que el agente enlazador se coloca en condiciones que permiten la unión del agente enlazador con el vehículo y/o el agente de direccionamiento.

Un décimo aspecto de la presente descripción es un vehículo de producto agroquímico dirigido específicamente, obtenido por el método anteriormente descrito. "Dirigido específicamente", tal y como se usa en el presente documento, significa que el vehículo se puede unir específicamente a un sitio de unión en una planta o en una parte de una planta, a través de al menos un agente de direccionamiento de acuerdo con la presente descripción, que está fijado, preferiblemente acoplado, lo más preferiblemente unido covalentemente, al vehículo.

Un último aspecto de la presente descripción es el uso de cualquier dominio de unión de acuerdo con la presente descripción para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión específica al sitio de unión o a un antígeno comprendido en dicho sitio de unión y para construir dominios de unión artificiales basados en dichas secuencias de aminoácidos. De hecho, en los dominios de unión de acuerdo con la presente descripción, se conocen las regiones estructurales y las regiones determinantes de complementariedad y el estudio de los derivados del dominio de unión, la unión al mismo sitio de unión o a un antígeno comprendido en dicho sitio de unión, permitirá deducir los aminoácidos esenciales implicados en la unión al sitio de unión o al antígeno comprendido en dicho sitio de unión. Este conocimiento puede ser usado para construir un dominio de unión mínimo y para crear derivados del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Unión de los dominios de unión (VHH) a la superficie de una hoja

Figura 1A: 5 µg/ml de VHH3E6 en PBS que se unen a la superficie de la hoja de patata natural. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

Figura 1B: 5 µg/ml de VHH3E6 en PBS que se unen a la superficie de la hoja de patata natural. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488; formación de imágenes con un sistema de microscopio confocal Leica SP5. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

- 5 Figura 1C: 5 µg/ml de VHH5D4 en PBS que se unen a la superficie de la hoja de patata natural. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. VHH 5D4 se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

- 10 Figura 1D: 5 µg/ml de CBM3a en PBS que se unen a tejido vegetal dañado en el borde de un disco de una hoja de patata. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. CBM3a no se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares o pelos de la hoja, pero solo se une al tejido vegetal dañado en el borde de un disco de hoja de patata que se expone al preparar la muestra mediante perforación de la hoja.

Figura 1E: Sin anticuerpo primario (PBS normal) en la superficie de una hoja de patata natural. Incubación con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488.

- 15 Figura 1F: 5 µg/ml de VHH3E6 en PBS que se unen a la superficie de la hoja de hierba mora natural. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

- 20 Figura 1G: 5 µg/ml de VHH3E6 en PBS que se unen a la superficie de la hoja de césped natural. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja y al tejido de la planta dañado en el borde de un disco de hoja de patata que se expone al preparar la muestra mediante perforación de la hoja.

Figura 2: Unión de los dominios de unión (VHH) a una planta viva intacta

- 25 Figura 2A: 5 µg/ml de VHH3E6 en PBS que se unen a una planta viva intacta. Hojas fijadas a una planta de patata en maceta se sumergieron en una solución de VHH 3E6. Se tomaron muestras de las hojas. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

- 30 Figura 2B: 5 µg/ml de VHH3E6 5 en PBS que se unen a una planta viva intacta. Hojas fijadas a una planta de patata en maceta se sumergieron en una solución de VHH 3E6. Se tomaron muestras de las hojas. Detección con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. Extracto de la hoja entera marcada. VHH 3E6 se une a la superficie de la hoja, estomas, tricomas glandulares y pelos de la hoja.

Figura 3: Acoplamiento de los dominios de unión con microcápsulas

- 35 Figura 3A: Microcápsulas con VHH3E6 acoplado a través de un acoplamiento químico con EDC de 1 etapa. Las microcápsulas acopladas se marcaron con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. Formación de imágenes con un sistema de microscopio confocal Leica SP5. VHH 3E6 se acopla a la superficie de la microcápsula a través de acoplamiento químico de 1 etapa.

Figura 3B: Microcápsulas con VHH3E6 acoplado a través de acoplamiento químico con EDC/NHS de 2 etapas. Las microcápsulas acopladas se marcaron con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. Formación de imágenes con un sistema de microscopio confocal Leica SP5. VHH 3E6 se acopla a la superficie de la microcápsula a través de acoplamiento químico con EDC/NHS de 2 etapas.

- 40 Figura 3C: Microcápsulas incubadas con VHH3E6 sin acoplamiento covalente. Los VHHs adsorbidos pasivamente se marcaron con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. Formación de imágenes con un sistema de microscopio confocal Leica SP5. Una fracción menor de VHH 3E6 se adsorbe pasivamente a la superficie de la microcápsula.

- 45 Figura 3D: Condición de control con microcápsulas no incubadas con VHH sino solo con anticuerpos anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488. Formación de imágenes con un sistema de microscopio confocal Leica SP5. Una fracción menor de VHH 3E6 se adsorbe pasivamente a la superficie de la microcápsula.

Figura 4: Unión y retención de las microcápsulas en la superficie de la hoja

- 50 Ensayo de unión de disco de hoja sobre discos de hojas de patata natural con microcápsulas que contienen una molécula de trazador fluorescente. La unión y la retención de microcápsulas acopladas con VHH específico que se une a la planta, acopladas con VHH de control no relacionado o microcápsulas en blanco, se compara. Se unen y se retienen 9 veces más microcápsulas acopladas con VHH específico sobre los discos de hojas de patata, que en comparación con las microcápsulas en blanco.

Figura 5: Reducción de la dosis utilizando microcápsulas acopladas con agentes de direccionamiento

Ensayo de unión de disco de hoja sobre discos de hojas de patata natural con microcápsulas que contienen una molécula de trazador fluorescente. La unión y la retención de microcápsulas con diferentes concentraciones y acopladas con VHH específico que se une a la planta, acopladas con VHH de control no relacionado o microcápsulas en blanco, se compara. Se unen y se retienen 8 veces más microcápsulas acopladas con VHH específico sobre los discos de hojas de patata, que en comparación con las microcápsulas en blanco.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: generación y selección de VHH****Inmunización de llamas con goma arábica, homogeneizado de hoja de patata u homogeneizado de hoja de trigo**

Una solución de goma arábica se preparó pesando 5 g de goma arábica procedente del árbol de acacia (Sigma) y disolviendo en 50 ml de agua. Se usó un ensayo de proteínas de Bradford para determinar la concentración de proteína total. Se prepararon partes alícuotas, se almacenaron a -80°C y se utilizaron para la inmunización. Hojas homogeneizadas procedentes de plantas de patata (*Solanum tuberosum* variedad Desirée) o de plantas de trigo (*Triticum aestivum* variedad Boldus) se prepararon mediante congelación de las hojas en nitrógeno líquido y homogeneizando dichas hojas con un mortero hasta obtener un polvo fino. Se usó un ensayo de proteínas de Bradford para determinar la concentración de proteína total. Se prepararon partes alícuotas, se almacenaron a -80°C y las suspensiones se utilizaron para la inmunización.

Las llamas se inmunizaron a intervalos semanales con 6 inyecciones intramusculares de goma arábica, hojas de patata homogeneizadas u hojas de trigo homogeneizadas, de acuerdo con procedimientos convencionales. Dos llamas, "404334" y "Lahaiana", se inmunizaron con goma arábica. Tres llamas, "407928", "Chilean Autumn" y "Niagara", se inmunizaron con hojas de patata homogeneizadas y otras dos llamas, "33733" y "Organza", se inmunizaron con hojas de trigo homogeneizadas. Las llamas "404334", "407928" y "33733" se inmunizaron usando adyuvante LQ (Gerbu) y las llamas "Lahaiana", "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza" se inmunizaron usando adyuvante incompleto de Freund (FIA). Las dosis para la inmunización de la llama "404334" eran 350 µg para cada día 0, 7, 14, 21, 28, 35 y se recogieron linfocitos de sangre periférica (PBL) el día 40. Las dosis para las inmunizaciones de las llamas "407928" y "33733" eran de 1 mg para cada día 0, 7, 14, 21, 28, 36 y se recogieron los PBL el día 40. En el momento de la recogida de PBL el día 40, se recogieron los sueros de las llamas "404334" "407928" y "33733". Las dosis para las inmunizaciones de las llamas "Lahaiana", "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza" eran 100 µg para el día 0 y 50 µg para los días 7, 14, 21, 28 y 35. El día 0, día 25 y en el momento de la recogida de PBL el día 38, se recogieron los sueros de las llamas "Lahaiana", "Chilean Autumn", "Niagara" y "Organza".

Construcción de la genoteca - A partir de cada llama inmunizada se preparó una genoteca de VHH independiente. Se aisló ARN a partir de linfocitos de sangre periférica, seguido de la síntesis de ADNc utilizando cebadores hexámeros aleatorios y Superscript III de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se realizó una primera PCR para amplificar VHH y VH utilizando una mezcla de cebador directo [relación 1:1 de call001 (5'-gtcctggctgctcttctacaagg-3') y call001b (5'-cctggctgctcttctacaagg-3')] y cebador inverso call002 (5'-ggtagctgctgtgaactgttcc-3'). Después del aislamiento de los fragmentos de VHH se realizó una segunda PCR utilizando el cebador directo A6E (5'-gatgtgcagctgcaggagtctgrrgagg-3') y el cebador inverso 38 (5'-ggactagtgcggcgcgtggagacggtgacctgggt-3'). Los fragmentos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*91I (Fermentas) y se ligaron aguas arriba del gen pIII en el vector pMES4 (GenBank: GQ907248.1). Los productos de la ligación precipitaron en etanol de acuerdo con protocolos convencionales, se resuspendieron en agua y se electroporaron en células TG1. Los tamaños de las genotecas oscilaban entre 1E+08 a 6E+08 clones independientes. Se realizó una PCR de una colonia única en clones recogidos al azar de las genotecas para evaluar los porcentajes de inserción de las genotecas. Todas las genotecas tenían porcentajes de inserción ≥ 90%, excepto la genoteca procedente de la llama inmunizada "Organza" que tenía un porcentaje de inserción del 80%. Las genotecas se numeraron 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32 para las llamas "404334", "407928", "33733", "Chilean Autumn", "Lahaiana", "Niagara" y "Organza", respectivamente. Se produjeron fagos a partir de cada una de las genotecas usando el fago auxiliar VCSM13 de acuerdo con procedimientos convencionales.

Selecciones de fagos contra goma arábica, extractos epidérmicos vegetales u hojas completas. Una solución de goma arábica se preparó pesando 5 g de goma arábica y disolviendo en 50 ml de agua. Se prepararon partes alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los extractos de cutícula de la planta de patata y la epidermis que se adhiere se prepararon a partir de tiras delgadas de los tallos de plantas de patata. Los extractos de cutícula de la planta de trigo y la epidermis que se adhiere se prepararon a partir de tiras delgadas de hojas de la envoltura del trigo. Extractos enriquecidos en glicanos de la pared celular y polisacáridos no celulósicos se extrajeron secuencialmente usando CDTA y NaOH (Moller et al., 2007), respectivamente. Las tiras se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron con un mortero hasta que se obtuvieron polvos finos. Los extractos enriquecidos en glicanos de la pared celular se prepararon mediante una resuspensión de los polvos finos en CDTA 50 mM pH 6,5 usando 10 ml por gramo de material molido y rotación de cabeza-sobre-cabeza a 4°C durante 30 min. El extracto y el material insoluble se separaron usando una jeringuilla adaptada con un filtro. Los extractos se limpiaron adicionalmente por centri-

fugación en una centrífuga micro a 20.000 g durante 5 min. Los extractos no celulósicos enriquecidos con polisacáridos se prepararon a partir del material insoluble después de la extracción con CDTA en NaOH 4 M y 1% de NaBH₄ utilizando 10 ml por gramo de material insoluble y rotación de cabeza-sobre-cabeza a 4°C durante 30 min. El extracto y el material insoluble se separaron usando una jeringuilla adaptada con un filtro. Los extractos se limpiaron adicionalmente por centrifugación en una microcentrífuga a 20.000 g durante 5 min. La primera ronda de selecciones frente a la goma arábica se realizó en pocillos de una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) recubiertos con 1 mg/ml o 10 µg/ml de goma arábica en tampón carbonato 0,1 M pH 8,3. Los recubrimientos se realizaron a 4°C durante la noche. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS (5% de MPBS). Los fagos se suspendieron en 2,5% de MPBS y se emplearon aproximadamente 2E+11 ufc para cada pocillo. Después de la unión a los pocillos a temperatura ambiente durante 2 horas, los fagos no unidos se eliminaron mediante un lavado a fondo con PBS/0,05% de Tween-20 y PBS. Los fagos unidos eluyeron a temperatura ambiente con 0,1 mg/ml de tripsina (Sigma) en PBS durante 30 min. Los fagos eluidos se transfirieron a una placa de polipropileno de 96 pocillos (Nunc) que contenía un exceso de inhibidor de tripsina AEBSF (Sigma). Los títulos de fago de los pocillos recubiertos con diana se compararon con los títulos de fago de los pocillos en blanco para evaluar los enriquecimientos. Los fagos se amplificaron usando células TG1 de nuevo aporte, de acuerdo con procedimientos convencionales.

La segunda ronda de selección se llevó a cabo de manera similar a la primera ronda de selección, excepto que para las genotecas 25 y 30 se recubrieron los pocillos con 10 µg/ml y 0,1 µg/ml de goma arábica en lugar de 1 mg/ml y 10 µg/ml. No se obtuvieron enriquecimientos significativos para las genotecas 27, 28, 29, 31 y 32 en la ronda de selección 1. En la ronda de selección 2, los enriquecimientos eran >1000 veces para las genotecas 28, 31 y 32, y de 25 veces y 250 veces para las genotecas 27 y 29, respectivamente. Los enriquecimientos para las genotecas 25 y 30 eran de 50 veces y >1000 veces en la ronda de selección 1, respectivamente. En la ronda de selección 2, los enriquecimientos eran de 1000 veces para ambas genotecas. Las selecciones frente a extracto epidérmico de patata con CDTA se realizaron de manera similar a las selecciones frente a goma arábica, pero los pocillos se recubrieron con 10 veces y 1000 veces más extracto epidérmico de patata con CDTA para ambas rondas de selección, la primera y la segunda. Los enriquecimientos en la ronda de selección 1 eran 10, 1E+03, 20, 20, >1E+04, 15 y 5 veces para las genotecas 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, respectivamente, y >100 veces para todas las genotecas en la ronda de selección 2. Las selecciones frente a extracto epidérmico de trigo con CDTA se realizaron de manera similar a las selecciones frente a extracto epidérmico de patata con CDTA pero los pocillos se recubrieron con extracto epidérmico de trigo con CDTA diluido 20 veces y 2000 veces para ambas rondas de selección, la primera y la segunda. Los enriquecimientos en la ronda selección 1 eran >10, >100, >10, 1, >1E+03, 10 y 5 veces para las genotecas 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, respectivamente. Los enriquecimientos en la ronda de selección 2 eran >10 veces para la genoteca 29 y >100 veces para las genotecas 25, 27, 28, 30, 31 y 32. Las selecciones frente a las hojas de patata se realizaron en dos rondas de selección consecutivas utilizando partículas de hoja en la ronda 1 y hojas enteras en la ronda 2. Las genotecas 27, 28, 29, 30, 31 y 32 se utilizaron para selecciones frente a las hojas. Las partículas de hoja para la primera ronda de selecciones se prepararon mediante la mezcla de hojas de patata en PBS usando un homogeneizador Ultra-Turrax T25. Las partículas de hoja se recogieron de la suspensión por centrifugación. El material sobrenadante, denominado aquí "fracción soluble de hoja homogeneizada", se enriquece presumiblemente en componentes intracelulares y se usó en solución durante la selección de fagos para desplazar aglutinantes de epítomos intracelulares. Las genotecas de fagos se preincubaron con la fracción soluble de hoja homogeneizada en MPBS al 2% utilizando rotación de cabeza-sobre-cabeza a temperatura ambiente durante 30 min. Las mezclas se añadieron a partículas de hoja y se incubaron con rotación de cabeza-sobre-cabeza a temperatura ambiente durante 2 horas. Las partículas de hoja con el fago unido se recogieron por centrifugación y se retiró el material sobrenadante. Las partículas de hoja con el fago unido se lavaron a fondo mediante lavados consecutivos con PBS. Los lavados se realizaron mediante una resuspensión de las partículas de hoja en PBS, centrifugando las partículas de hoja y retirando el material sobrenadante. La elución del fago y la infección de TG1 se realizaron como anteriormente. Para la segunda ronda de selecciones se usaron hojas enteras intactas. Las hojas se incubaron flotando al revés en soluciones de fago en MPBS al 2% y se permitió que los fagos se unieran a temperatura ambiente durante 2 horas. Las hojas se lavaron a fondo mediante una transferencia de las hojas a tubos de nuevo aporte con PBS. La elución de los fagos unidos se realizó con TEA 100 mM en agua y las soluciones con fagos eluidos se neutralizaron usando la mitad del volumen de fago eluido de Tris 1 M pH 7,5. La infección de TG1 se realizó como anteriormente.

Recogida de colonias individuales a partir de los resultados de la selección - Los clones individuales se recogieron a partir de selecciones de la primera y segunda ronda frente a goma arábica con las genotecas 25 y 30. A partir de las selecciones frente a goma arábica con las genotecas de 27, 28, 29, 31 y 32, los clones se recogieron después de selecciones de la segunda ronda pero no selecciones de la primera ronda. Se recogió un total de 208 clones a partir de selecciones con goma arábica. A partir de selecciones frente a extracto epidérmico de patata con CDTA se recogió un total de 321 clones después de ambas selecciones, de la primera ronda y la segunda, de todas las genotecas. A partir de las selecciones frente a extracto epidérmico de trigo con CDTA se recogió un total de 162 clones después de selecciones de la segunda ronda de todas las genotecas. A partir de las selecciones de hoja de patata se recogió un total de 184 clones después de selecciones de la segunda ronda de las genotecas 27, 28, 29, 30, 31 y 32. Células TG1 de nuevo aporte se infectaron con fago eluido diluido en serie y se sembraron en agar LB; 2% de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias individuales se recogieron en placas de 96 pocillos que contenían 100 µl por pocillo de 2xTY; 10% de glicerol; 2% de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C y se almacenaron a -80°C como placas maestras.

Ejemplo 2: Caracterización del VHH

ELISA de unión de un solo punto - Se utilizó un ELISA de unión de un solo punto para identificar los clones que se unen a la goma arábica o a extractos de plantas. Los extractos que contenían VHH para el ELISA se prepararon del modo siguiente. Placas de 96 pocillos con 100 µl por pocillo de 2xTY, 2% de glucosa, 100 µg/ml de ampicilina se inocularon a partir de las placas maestras y se cultivaron a 37°C durante la noche. Se emplearon 25 µl por pocillo de cultivo de una noche para inocular placas de 96 pocillos con pocillos profundos de nuevo aporte que contenían 1 ml por pocillo de 2xTY; 0,1% de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Después de crecer a 37°C en una incubadora con agitación durante 3 horas, se añadió IPTG hasta tener 1 mM de concentración final y el VHH recombinante se produjo durante una incubación adicional durante 4 horas. Las células se centrifugaron por centrifugación a 3000 g durante 20 min y se almacenaron a -20°C durante la noche. Los sedimentos celulares se descongelaron, se agitaron con vórtex brevemente y se añadieron 125 µl de PBS por pocillo a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en una plataforma de agitación para ELISA a temperatura ambiente durante 15 min. Las placas se centrifugaron a 3000 g durante 20 min y 100 µl por pocillo de extracto que contenía VHH se transfirieron a placas de polipropileno de 96 pocillos (Nunc) y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

La unión de clones procedentes de selecciones de goma arábica se analizó en placas de ELISA recubiertas con 100 µl/pocillo de goma arábica a 1 mg/ml en tampón carbonato pH 8,3. La unión de clones procedentes de selecciones de extracto epidérmico de patata con CDTA se analizó tanto en extracto epidérmico de patata con CDTA como en extracto epidérmico de trigo con CDTA, usando placas de ELISA recubiertas con 100 µl por pocillo de extracto epidérmico de patata con CDTA diluido 30 veces y extracto epidérmico de trigo con CDTA diluido 30 veces en carbonato 0,1 M pH 8,3. La unión de clones procedentes de selecciones de extracto epidérmico de trigo con CDTA se analizó usando placas de ELISA recubiertas con 100 µl por pocillo de extracto epidérmico de trigo con CDTA diluido 20 veces en carbonato 0,1 M pH 8,3. Después del recubrimiento a 4°C durante la noche y un recubrimiento continuo a temperatura ambiente durante 1 hora al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1,5 horas. Las placas se vaciaron y se llenaron con 90 µl por pocillo de 1% de MPBS. Se añadieron 10 µl de extracto que contenía VHH de cada clon a (un) pocillo(s) recubierto(s) con antígeno y un pocillo en blanco. Se permitió que el VHH uniera a temperatura ambiente durante 1 hora y el VHH sin unir se eliminó lavando tres veces con PBS/0,05% de Tween-20. El VHH unido se detectó con incubaciones secuenciales con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina (Abd Serotec) en 1% de MPBS/0,05% de Tween-20 y anticuerpos de molécula completa de IgG de conejo anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1% de MPBS/0,05% de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05% de Tween-20. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y 100 µl de sustrato disódico hexahidratado pNPP (Sigma) se añadieron a cada pocillo.

La absorbancia a 405 nm se midió y se calculó la relación de VHH unido frente a (un) pocillo(s) recubierto(s) diana y un pocillo recubierto que no era diana para cada clon. Un 23% de los clones tenía una relación superior a 2 y esos clones se recogieron en primer lugar para una caracterización más detallada. Un segundo grupo de clones con una relación entre 1,15 y 2 y que comprendía un 10% de todos los clones, fue revisado más tarde. Los clones con una relación menor de 1,15 no se analizaron adicionalmente.

Para los clones procedentes de selecciones de hojas enteras, se desarrolló un ELISA adaptado. Discos de hojas que flotaban al revés se utilizaron en lugar de los pocillos de recubrimiento con antígeno. Las incubaciones fueron similares a los extractos de ELISA. Después de la incubación con el sustrato, los discos de hojas se retiraron de los pocillos usando un fórceps y se midió la absorbancia a 405 nm. Se compararon las señales obtenidas para cada clon con señales obtenidas a partir de los pocillos con discos de hojas sin incubación con anticuerpo primario y se calcularon las relaciones. Un anticuerpo que se unía a la superficie de las hojas que se encontró y se caracterizó a partir de selecciones de extractos epidérmicos, se utilizó como anticuerpo de control positivo. Los VHH con una relación mayor que 1,5 se analizaron adicionalmente mediante secuenciación.

PCR de colonias individuales y secuenciación - Una PCR de colonias individuales y una secuenciación se realizaron en clones positivos para el ELISA del modo siguiente. Cultivos procedentes de pocillos de la placa maestra con clones positivos para el ELISA se diluyeron 10 veces en agua estéril. Se emplearon 5 µl de estos clones diluidos como molde para la PCR utilizando el cebador directo MP57 (5'-ttatgcttccggctcgtatg-3') y el cebador inverso Gill (5'-ccacagacagccctcatag-3'). Los productos de la PCR fueron secuenciados mediante secuenciación de Sanger usando el cebador MP57 (VIB Genetic Service Facility, Universidad de Amberes, Bélgica).

Producción de anticuerpos y purificación - Los fragmentos de anticuerpo con VHH fueron producidos en la cepa TG1 supresora de *E. coli* o la cepa no supresora WK6 (Fritz et al., Nucleic Acids Research, Volumen 16 Número 14 1988) de acuerdo con procedimientos convencionales. Brevemente, se hicieron estrías con colonias y cultivos de una noche a partir de colonias individuales inoculadas en 2xTY; 2% de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Se utilizaron los cultivos de una noche para inocular cultivos de nuevo aporte 1:100 en 2xTY; 0,1% de glucosa; 100 µg/ml de ampicilina. Después de crecer a 37°C en una incubadora con agitación durante 3 horas, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se produjeron fragmentos de anticuerpos con VHH recombinantes durante una incubación adicional durante 4 horas. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1/50° del volumen de cultivo original de tampón de extracción periplásmica (fosfato 50 mM pH 7; NaCl 1 M; EDTA 1 mM) y se incubaron con rotación de cabeza-sobre-cabeza a 4°C durante la noche. Los esferoplastos se centrifugaron mediante centrifuga-

ción a 3000 g y 4°C durante 20 min. El material sobrenadante se transfirió a tubos de nuevo aporte y se centrifugaron de nuevo a 3000 g y 4°C durante 20 min. Los fragmentos de anticuerpo con VHH marcados con hexahistidina se purificaron a partir del extracto periplásmico usando 1/15° del volumen del extracto, de resina de afinidad a metal TALON (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados de anticuerpo con VHH se concentraron y se dializaron frente a PBS utilizando dispositivos Vivaspin 5 kDa de MWCO (Sartorius Stedim), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Unión de VHH a goma arábica en ELISA - La titulación de los fragmentos de anticuerpo con VHH se realizó sobre placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) recubiertas con 100 µl por pocillo de 100 µg/ml de goma arábica en carbonato 50 mM pH 9,6. Las placas se recubrieron a 4°C durante la noche y el recubrimiento continuó a temperatura ambiente durante 1 hora el día siguiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Se prepararon diluciones en serie de 4 veces de fragmentos purificados de anticuerpo con VHH en 1% de MPBS/0,05% de Tween-20 en placas de polipropileno de 96 pocillos. Las concentraciones de anticuerpo variaron de 3 µg/ml a 12 ng/ml. Las diluciones de anticuerpo se transfirieron a placas recubiertas con goma arábica y se dejó que los fragmentos de anticuerpo con VHH se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Los VHH unidos se detectaron con incubaciones secuenciales con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina (Abd Serotec) y anticuerpos de molécula completa de IgG de conejo anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1% de MPBS/0,05% de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05% de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato disódico hexahidratado pNPP (Sigma) a cada pocillo. La absorbancia a 405 nm se midió y se representó gráficamente como una función de la concentración de anticuerpos (véase la tabla 1).

Tabla 1:

[VHH] (µg/ml)		3	3	0,75	0,1875	0,04688	0,0117188
[VHH] (nM)		200	200	50	12,5	3,125	0,78125
Goma arábica (100µg/ml)		-	+	+	+	+	+
		1	2	3	4	5	6
VHH3E6	A	0,090	2,154	1,904	1,518	0,905	0,392
VHH5C4	B	0,082	2,010	1,710	1,036	0,386	0,166
VHH5D4	C	0,075	1,280	0,840	0,378	0,134	0,087
VHH5G5	D	0,077	1,966	1,611	0,906	0,317	0,125
VHH5E5	E	0,073	1,194	0,569	0,185	0,088	0,074
VHH7D2	F	0,074	1,427	0,906	0,347	0,136	0,083
VHH7C2	G	0,077	0,461	0,194	0,090	0,092	0,088
VHH5F5	H	0,090	0,959	0,476	0,191	0,100	0,093
VHH7A2	F	0,075	1,391	0,677	0,216	0,101	0,088

Unión de VHH a lectina de patata en ELISA

Las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) recubiertas con 100 µl por pocillo de 100 µg/ml de lectina de patata (Sigma) en PBS, se recubrieron a 4°C durante la noche y el recubrimiento continuó a temperatura ambiente durante 1 hora el día siguiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Los VHH (3 µg/ml) se transfirieron a las placas recubiertas con lectina de patata y se permitió que los fragmentos de anticuerpos con VHH se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Los VHH unidos se detectaron con incubaciones secuenciales con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina (Abd Serotec) y anticuerpos de molécula completa de IgG de conejo anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina (RaM/AP) (Sigma) en 1% de MPBS/0,05% de Tween-20. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando tres veces con PBS/0,05% de Tween-20 después de cada incubación de anticuerpo. Las placas se lavaron dos veces más con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato disódico hexahidratado pNPP (Sigma) a cada pocillo y se midió la absorbancia a 405 nm (véase la tabla 2).

Tabla 2:

	VHH 3E6	VHH 5D4	VHH 5C4	VHH 5G5	VHH 7D2	< en blanco
Goma arábica	0,882	0,530	0,873	0,751	0,274	0,069
Lectina de patata	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	0,081

	VHH 3E6	VHH 5D4	VHH 5C4	VHH 5G5	VHH 7D2	< en blanco
En blanco	0,067	0,072	0,071	0,073	0,072	0,072

Ejemplo 3: Unión de dominios de unión a la superficie vegetal

Unión de VHH a discos de hojas - La unión de VHH a discos de hojas de patata sin fijar (variedad Désirée), hierba mora, césped, trigo o azalea, se investigó. A modo de comparación, la unión de CBM3a a discos de hojas sin fijar de patata (variedad Désirée) se analizó en paralelo. Los discos de hojas se prepararon perforando una hoja de patata fresca con una herramienta perforadora de agujeros de 5 mm. Los discos de hojas se colocaron inmediatamente en pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía 200 µl por pocillo de 5% de MPBS o PBS y se incubaron durante 30 min. Los discos de hojas se transfirieron a soluciones que contenían 5 µg/ml de fragmento de anticuerpo con VHH, respectivamente 5 µg/ml de CBM3a en 2% de MPBS o PBS y se incubaron durante 60-90 min. Los VHH o proteínas CBM3a sin unir se eliminaron lavando tres veces con 2% MPBS o PBS. Los VHH o proteínas CBM3a unidas se detectaron incubando con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina conjugados directamente con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en 1% de MPBS durante 1 hora. Los anticuerpos sin unir se eliminaron lavando tres veces con PBS. Los discos de hojas se colocaron en portaobjetos de vidrio, cubiertos con cubreobjetos y se analizaron por microscopía o en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon) o un sistema de microscopio confocal SP5 (Leica). Por medio de un ejemplo no limitante, se observó que los fragmentos de anticuerpo con VHH (por ejemplo, 3E6, 5D4) se unían claramente a tricomas, estomas y cutícula en la superficie foliar de las hojas de patata (Figura 1A-C). En claro contraste, se detectó que CBM3a no se unía a la superficie de las hojas de patata y solo se observó una ligera unión con el tejido dañado en el borde cortado del disco de hoja de patata (Figura 1D). Algunos VHH de esta invención (por ejemplo, 3E6) también se observó que se unían específicamente a la superficie de las hojas de hierba mora u hojas de césped, o como se muestra en la Figura 1F y 1G, respectivamente. Se observó una unión no significativa a la superficie de hojas de trigo o de azalea.

Unión de VHH a plantas vivas intactas - La unión de los VHH a plantas vivas intactas se investigó en plantas de patata en maceta (variedad Désirée). Hojas compuestas de plantas vivas intactas se sumergieron en soluciones de VHH marcados con hexahistidina en PBS, o solo PBS para las condiciones de control, dejando las hojas compuestas fijadas a las plantas. Se permitió que los VHH se unieran durante 1 hora. A continuación, las hojas compuestas todavía fijadas a las plantas se lavaron cinco veces en PBS en matraces Erlenmeyer. Se tomaron muestras de diferentes hojas y secciones de peciolo. Se detectaron los VHH unidos mediante incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en PBS durante 1 hora. Los anticuerpos anti-histidina no unidos se retiraron lavando cinco veces con PBS. Hojas enteras, discos de hojas o secciones de peciolo se analizaron en busca de los VHH unidos con microscopía. Se demostró que los VHH se unían a estructuras de la hoja tales como tricomas y estomas, superficie foliar y secciones de peciolo, como se muestra en la Figura 2. No se observó unión con los VHH de control no relacionado, demostrando que los VHH de esta invención son capaces de unirse específicamente a plantas vivas intactas.

Unión de VHH en agua - La unión de los VHH a la superficie de las hojas en agua se investigó en discos de hojas cortados de hojas de plantas de patata (variedad Désirée). Los discos de hojas se lavaron tres veces en agua ultrapura. Los VHH marcados con hexahistidina se diluyeron en agua ultrapura, se añadieron a los discos de hojas y se permitió que se unieran durante 1 hora. Aunque las soluciones madre de VHH estaban en PBS, las diluciones utilizadas ahí (de 200 veces para 5 µg/ml, o 2000 veces para 500 ng/ml) dieron lugar a una dilución significativa de PBS a partir de las soluciones madre y se pueden considerar suficientemente diluidas para representar la unión en agua. Después de permitir que los VHH se unieran durante 1 hora, los discos de hojas se lavaron cinco veces con agua ultrapura. Los VHH unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en PBS durante 1 hora. Los anticuerpos anti-histidina no unidos se retiraron lavando cinco veces con PBS. Los discos de hojas se analizaron en busca de los VHH unidos con microscopía. La unión de los VHH en PBS se analizó como se ha descrito anteriormente, como una condición de control. La detección de los VHH unidos con anticuerpos anti-histidina conjugados con colorante fluorescente Alexa-488, eliminando por lavado los anticuerpos anti-histidina no unidos y analizando los VHH unidos con microscopía, se realizó como para el experimento de unión de los VHH en agua. Se demostró que los VHH se unen en agua a estructuras de la hoja tales como tricomas y estomas y a la superficie de la hoja. No se observó una unión con los VHH de control no relacionados. La unión observada en agua era similar a la observada para el experimento paralelo realizado en PBS. Los VHH de esta invención son capaces de unirse a estructuras de la hoja y a la superficie de la hoja en agua.

Cinética de la unión de VHH - Con el fin de estudiar adicionalmente la aplicabilidad de los VHH como aglutinantes para aplicaciones en invernadero o en el campo, en donde supuestamente la unión se debe lograr rápidamente después de la aplicación, se empleó un experimento de unión de los VHH, sumergiendo una hoja para analizar los tiempos de incubación mínimos de los VHH para lograr una unión detectable. Discos de hoja de patata (variedad Désirée) de 8 mm de $\varnothing$ se cortaron utilizando una herramienta perforadora y se lavaron 3 veces en PBS. Prediluciones de 5 µg/ml de VHH marcados con hexahistidina se prepararon en PBS y se incubaron durante tiempos diferentes con los discos de hojas. Los tiempos de incubación fueron 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 20

minutos o 1 hora. Los VHH sin unir se eliminaron lavando cinco veces con PBS. Los VHH unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en PBS durante 1 hora. Los anticuerpos anti-histidina no unidos se retiraron lavando cinco veces con PBS. Los discos de hojas se analizaron en busca de los VHH unidos con microscopía. La unión específica se observó para cada muestra con los VHH específicos, desde un tiempo de incubación de 10 segundos hasta un tiempo de incubación 1 hora para los VHH. No se observó unión con los VHH de control no relacionados. Los VHH de esta invención muestran una unión detectable a las estructuras de la hoja, tales como tricomas y estomas y la superficie de la hoja al cabo de 10 segundos después de la aplicación.

Unión de VHH con diferentes pH - Con el fin de estudiar la aplicabilidad de los VHH como aglutinantes para aplicaciones en invernadero o en el campo, en donde la unión puede tener lugar supuestamente con valores de pH que se desvían fuertemente de las condiciones fisiológicas en las cuales los anticuerpos se unen naturalmente a sus dianas, se llevó a cabo un experimento de unión de los VHH, sumergiendo una hoja en una serie de soluciones con diferentes pH. Se prepararon las siguientes soluciones: glicina 50 mM pH 2,0, acetato de sodio 50 mM pH 4,0, carbonato de sodio 50 mM pH 9,6 e hidróxido de sodio 10 mM pH 11,0. Discos de hoja de patata (variedad Desirée) de 8 mm de $\varnothing$ se cortaron utilizando una herramienta perforadora. Los discos de hojas se equilibraron primero con el pH diferente lavando tres veces con soluciones con pH diferente. Los VHH marcados con hexahistidina se diluyeron hasta 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en soluciones con diferentes pH, se añadieron a los discos de hojas equilibrados correspondientes y se permitió la unión de los VHH durante 1 hora. Después de la incubación con los VHH, los discos de hojas se lavaron tres veces con soluciones con el pH diferente correspondiente. Después de ello, todos se lavaron 2 veces con PBS para equilibrar los discos de hojas con el PBS. Los VHH unidos se detectaron mediante incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en PBS durante 1 hora. Los anticuerpos anti-histidina no unidos se retiraron lavando cinco veces con PBS. Los discos de hojas se analizaron en busca de VHH unidos con microscopía. Algunos de los VHH de esta invención (por ejemplo VHH 3E6) mostraron una unión detectable a los discos de hojas en todo el intervalo sometido a ensayo desde pH 2 a pH 11.

Unión de VHH a diferentes temperaturas - Con el fin de someter a ensayo la aplicabilidad de los VHH como aglutinantes para aplicaciones de invernadero o de campo, en donde la unión supuestamente puede ocurrir a diferentes temperaturas y a veces incluso a temperaturas extremas, se utilizó un experimento de unión de los VHH, sumergiendo una hoja a diferentes temperaturas. Las temperaturas utilizadas fueron 4°C, temperatura ambiente, 37°C, 55°C o 70°C. Discos de hoja de patata (variedad Desirée) de 8 mm de $\varnothing$ se cortaron utilizando una herramienta perforadora. Los discos de hoja se equilibraron a diferentes temperaturas lavando tres veces con PBS a diferentes temperaturas. Los VHH marcados con hexahistidina se diluyeron hasta 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS a diferentes temperaturas, se añadieron a los discos de hojas equilibrados correspondientes y se permitió la unión de los VHH durante 1 hora a diferentes temperaturas. Después de la incubación con los VHH, los discos de hojas se lavaron cinco veces con PBS a temperatura ambiente. Los VHH unidos se detectaron por incubación con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-histidina no unidos se retiraron lavando cinco veces con PBS a temperatura ambiente. Los discos de hojas se analizaron en busca de VHH unidos con microscopía. Algunos de los VHH de esta invención (por ejemplo VHH 3E6) mostraban una unión detectable a discos de hojas en un intervalo de temperatura de 4°C a 55°C. Se debe tener en cuenta que los discos de hojas se ven seriamente afectados cuando se sumergen en PBS a 70°C durante 1 hora, pero que la unión de los VHH todavía se podía detectar.

Ejemplo 4: Acoplamiento de agentes de direccionamiento a micropartículas

Construcción, producción y purificación de VHH bivalentes - Estructuras artificiales de VHH bivalentes se produjeron en bacterias mediante la clonación de dos secuencias de VHH en tándem en el vector pASF22, creando una fusión de dos VHH con un enlazador de 9 glicinas-serinas (GGGGSGGGS) entre los dos VHH. pASF22 es un derivado de pMES preparado en la compañía. Los marcadores que se utilizaron eran c-Myc C-terminal (EQKLISEEDLN) y hexahistidina (HHHHHH). Un enlazador de triple alanina (AAA) se colocó entre el extremo C-terminal de VHH y el marcador c-Myc y un enlazador de glicina-alanina-alanina (GAA) se utilizó entre el extremo C-terminal del marcador c-Myc y el marcador de hexahistidina. La secuencia completa C-terminal del VHH bivalente que se utilizó: AAA-EQKLISEEDLN-GAA-HHHHHH. Cultivos de una noche de nuevo aporte fueron producidos partiendo de estrías de colonias y la inoculación de medios 2xTY complementados con 2% de glucosa y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina. Se utilizaron los cultivos de una noche para inocular cultivos de nuevo aporte 1:100 en medios 2xTY con 0,1% de glucosa y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina. Después de cultivar a 37°C en una incubadora con agitación durante 3 horas, se añadió IPTG hasta una concentración final 1 mM y se produjeron VHH bivalentes recombinantes durante una incubación adicional de 4 horas. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1/50ª parte del volumen del cultivo original de PBS y se incubaron con rotación de cabeza-sobre-cabeza a 4°C durante 30 minutos. Los esferoplastos se centrifugaron por centrifugación a 3000 g y 4°C durante 20 minutos. El material sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se centrifugaron de nuevo a 3000 g y 4°C durante 20 minutos. Se recogió el material sobrenadante y la concentración de cloruro de sodio se ajustó a 500 mM e imidazol a una concentración de 20 mM. Los VHH bivalentes marcados con hexahistidina se purificaron a partir de los extractos empleando columnas HisTrap FF Crude de 5 ml IMAC (GE Lifesciences) y una columna de filtración en gel de grado prep HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE Lifesciences) sobre un sistema AKTApurify (GE Lifesciences) siguiendo los procedimientos convencionales.

Acoplamiento de VHH a las micropartículas - En primer lugar se examinó si los VHH que están unidos covalentemente a micropartículas se pueden unir a su diana y proporcionar una fuerza de adhesión suficiente a una superficie que contiene el antígeno, para dirigir la micropartícula a la diana. Las micropartículas se acoplaron con fragmentos de anticuerpos con VHH específicos de goma arábica y se investigó la unión a placas de ELISA recubiertas de goma arábica.

Se prepararon diferentes tipos de micropartículas. Los fragmentos purificados de anticuerpos con VHH (i) se acoplaron a Dynabeads M-270 paramagnéticas de 2,8 µm de Ø de ácido carboxílico (Dynal, Invitrogen), usando química de acoplamiento de 2 etapas con activación EDC de las perlas y posterior acoplamiento de fragmentos de anticuerpos con VHH y (ii) se acoplaron usando química de acoplamiento de 1 etapa a microesferas FluoSpheres fluorescentes de 2 µm de Ø (Molecular Probes, Invitrogen), ambas según las instrucciones de los fabricantes.

Brevemente, para el acoplamiento a Dynabeads M-270 de ácido carboxílico: los VHH se dializaron frente a tampón MES 50 mM pH 5,0 usando dispositivos de filtro de centrifugado Vivaspin de 5 kDa (Sartorius Stedim). Las perlas se prepararon mediante 2 lavados secuenciales con NaOH 10 mM y 3 lavados con agua y se activaron con EDC 0,1 M (Pierce) a temperatura ambiente durante 30 min. Las perlas activadas con EDC se lavaron mediante lavados secuenciales rápidos con agua helada y tampón MES 50 mM enfriado sobre hielo pH 5,0. Las perlas se entregaron con el último lavado. Se añadieron 60 µg de fragmento de anticuerpo con VHH en 100 µl de MES 50 mM pH 5,0 a perlas de 3 mg y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. El material sobrenadante se recogió después del acoplamiento. Mediante la medición de proteínas a A280 de la fracción no unida, se calcularon las cantidades de VHH acoplados y no acoplados. Se acopló más del 95% del fragmento de anticuerpo con VHH a las perlas. Las perlas se bloquearon con Tris 50 mM pH 7,4 y se lavaron tres veces con PBS/0,1% de Tween-20 y se almacenaron a 4°C. Brevemente, para el acoplamiento a microesferas fluorescentes FluoSpheres: los VHH se dializaron frente a tampón MES 50 mM pH 6,0 usando dispositivos de filtro de centrifugado Vivaspin de 5 kDa (Sartorius Stedim). Unos dispositivos de filtro de 0,8 µm de PES (Sartorius Stedim) se utilizaron durante todo el procedimiento para aislar las perlas de la solución. Las perlas se prepararon lavando con agua ultrapura y una resuspensión en agua ultrapura. Se añadieron 100 µl de fragmentos de anticuerpo con VHH que contenían 200 µg de VHH a 100 µl de perlas. Se añadieron 0,8 mg de EDC (Pierce) a cada mezcla de las perlas con VHH y el pH se ajustó a 6,5 con NaOH 0,1 M. El acoplamiento se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas. La glicina se añadió hasta una concentración final de 100 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para inactivar la reacción. Mediante una medición de proteínas a A280 de la fracción no unida, se calcularon las cantidades de VHH acoplado y no acoplado. Entre un 14% y un 33% de los diferentes fragmentos de anticuerpos con VHH se acoplaron a las perlas. Las perlas se lavaron dos veces con fosfato 50 mM pH 7,4; 0,9% de NaCl (PBS 50 mM) y se almacenaron en BSA al 1%, azida de sodio 2 mM en PBS 50 mM.

Acoplamiento de agentes de direccionamiento a microcápsulas que contienen trazador fluorescente o ingrediente activo - Las microcápsulas de poliurea se produjeron mediante polimerización interfacial. Con el objetivo de generar microcápsulas de poliurea funcionalizadas, los VHH se acoplaron a microcápsulas que contenían o bien el insecticida lambda cihalotrina o la molécula de trazador fluorescente Uvitex OB y una envuelta con lisina incorporada a los residuos de ácidos carboxílicos expuestos en la superficie. Lambda cihalotrina se disolvió en benzoato de bencilo en concentraciones entre 30% y 66% antes de la encapsulación. Alternativamente, se utilizó un núcleo de 1,5% de Uvitex en benzoato de bencilo para una visualización fluorescente facilitada de las microcápsulas. Diisocianato de tolueno (TDI) y poli(isocianato de metileno) (PMPPI) se disolvieron en la fase oleosa en diferentes proporciones y concentraciones en la fase oleosa para producir las características deseadas de las envueltas. La tasa de agitación para la emulsión se varió para controlar el tamaño de las gotitas y, en consecuencia el diámetro de las microcápsulas. Las microcápsulas con diámetros aproximados de 5 µm, 10 µm o 50 µm se produjeron con éxito. La lisina bifuncional y la dietilentriamina (DETA) trifuncional se utilizaron en diferentes proporciones y/o se añadieron secuencialmente durante la encapsulación para, por un lado, maximizar las cantidades de ácidos carboxílicos en la superficie de las microcápsulas y, por otro lado, obtener una resistencia suficiente de las envueltas de las cápsulas. Las microcápsulas se lavaron con agua después de la producción y se almacenaron como suspensiones de microcápsulas en agua. Las microcápsulas se lavaron con MES 100 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0 inmediatamente antes del acoplamiento de VHH, utilizando un matraz de filtración estanco al vacío y un embudo de filtro P 1.6 (Duran). Alternativamente, se emplearon soportes de filtro de vidrio con filtros de membrana desechables de 0,45 µm (Millipore) o placas de filtración de 0,45 µm de 96 pocillos profundos (Millipore). Los acoplamientos de VHH a las microcápsulas se realizaron usando acoplamientos mediados por carbodiimida usando un procedimiento de 1 etapa, un procedimiento de 2 etapas sin N-hidroxisuccinimida (NHS), o un procedimiento de 2 etapas con NHS. La principal diferencia entre el acoplamiento de 1 etapa y los procedimientos de acoplamiento de 2 etapas, es el hecho de la reticulación de VHH en los procedimientos de acoplamiento de 1 etapa. Los protocolos para los tres procedimientos son muy similares y se diferencian del modo siguiente. Para los acoplamientos de 1 etapa, los VHH se añadieron a microcápsulas lavadas y se añadió clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (Pierce) y se permitió la reacción de acoplamiento durante 2 horas a temperatura ambiente. Para los acoplamientos de 2 etapas, las microcápsulas lavadas se activaron primero con EDC en presencia o ausencia de NHS. Un exceso de EDC sin reaccionar (y NHS) se eliminó mediante lavados secuenciales rápidos con tampones enfriados con hielo y se añadieron los VHH y se dejaron reaccionar con ácidos carboxílicos activados sobre las envueltas de las microcápsulas. Para las microcápsulas de 10 µm de Ø, se acoplaron 2-20 µg de VHH por mg de microcápsula. Para las microcápsulas con otros diámetros, las cantidades se modificaron en consecuencia. Después del acoplamiento de los VHH, las microcápsulas se

lavarón con PBS y se almacenaron en PBS. El éxito del acoplamiento de los VHH se investigó usando una combinación de análisis de la eficiencia del acoplamiento mediante SDS-PAGE y analizando la unión de VHH marcado con hexahistidina mediante microscopía o un sistema de microscopio confocal SP5 (Leica) utilizando anticuerpos anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488. Con el análisis SDS-PAGE se observó la formación de multímeros para las reacciones de acoplamiento de 1 etapa, como se esperaba. Las microcápsulas acopladas a VHH se marcaron con anticuerpos anti-histidina durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-histidina sin unir se eliminaron lavando cinco veces con PBS utilizando placas de filtración con pocillos profundos de 0,45 µm de 96 pocillos (Millipore). Las microcápsulas con VHH acoplado, las microcápsulas incubadas con VHH a las que no se había añadido EDC y las microcápsulas en blanco se compararon. El marcado con anti-histidina de las microcápsulas era más intenso para las microcápsulas a las que se había acoplado VHH usando los procedimientos de acoplamiento de 1 etapa o 2 etapas, como se muestra en la Figura 3. También se observó que algunos VHH se adsorbían pasivamente a las microcápsulas. Los VHH se acoplaron con éxito a las microcápsulas de diferente tamaño usando procedimientos de acoplamiento de 1 etapa o 2 etapas.

Ejemplo 5: Unión de micropartículas acopladas con agente de direccionamiento a la superficie que contiene antígeno

Ensayos de unión con perlas o microcápsulas acopladas a VHH - La funcionalidad de las micropartículas acopladas a VHH se investigó en placas de ELISA que se recubrieron con 100 µg/ml de goma arábica en carbonato 50 mM pH 9,6 o PBS. El recubrimiento se realizó durante la noche y las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1,5 horas. Perlas paramagnéticas acopladas a VHH se diluyeron 50 veces y se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-histidina directamente conjugados con colorante fluorescente Alexa-488 (Abd Serotec) en 1% de MPBST durante 1 hora. Diluciones dobles en serie (de 50 a 800 veces) de Dynabeads paramagnéticas conjugadas con VHH y perlas fluorescentes FluoSpheres se prepararon en MPBS al 2%, se transfirieron a placas de ELISA recubiertas de goma arábica y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las perlas no unidas se eliminaron lavando cinco veces con PBS/0,05% de Tween-20. Los fondos de los pocillos de la placa de ELISA se analizaron en busca de perlas unidas mediante microscopía. Se empleó un recuento de las perlas y el uso de una máscara para la cámara del microscopio para el cálculo del área de la superficie analizada, para calcular el número de perlas unidas por pocillo como se muestra en la tabla 3. Alternativamente, las micropartículas se visualizaron utilizando un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon) y se realizó el recuento usando el programa informático de análisis de imágenes Volocity (PerkinElmer); el número de Fluospheres unidas por cada pocillo se muestra en la tabla 4.

Tabla 3: Recuento de Dynabeads magnéticas de ácido carboxílico unidas a pocillos recubiertos con goma arábica

Dilución	Goma arábica	Dynabeads magnéticas de ácido carboxílico 2,8 µm (número aproximado)	
		Acopladas con VHH 3E6	Acopladas con VHH 5D4
50	+	≈1000	≈500
100	+	≈500	≈500
200	+	≈200	≈200
400	+	≈100	≈200
800	+	≈100	≈100
50	-	≈10	≈50

Tabla 4: Recuento de Fluospheres unidas a pocillos recubiertos con goma arábica

Recubrimiento	Número de Fluospheres añadidas	Fluospheres acopladas con VHH 3E6	Fluospheres acopladas con VHH no relacionado
Sin recubrimiento	4,5. 10 ⁶	115	198
Goma arábica	4,5. 10 ⁶	1874	224
Goma arábica	2,3. 10 ⁶	1273	89
Goma arábica	1,1. 10 ⁶	981	83

Una configuración de ensayo similar a ELISA se utilizó para evaluar la interacción de las microcápsulas acopladas a VHH con las superficies que contenían antígeno. Las placas de ELISA (Maxisorp (Thermo Scientific Nunc) o las microplacas de media área de unión elevada (Greiner Bio-One)) se recubrieron con goma arábica o lectina de patata. Los recubrimientos se realizaron durante la noche con 100 µg/ml de goma arábica o lectina de patata en PBS.

Los pocillos de control incluían pocillos en blanco o pocillos recubiertos con antígenos no relacionados. Las placas se lavaron tres veces con PBS con 0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 a 2 horas. Las microcápsulas que contenían lambda cihalotrina acopladas con VHH o que contenían Uvitex se diluyeron hasta las densidades apropiadas en 1% de leche desnatada en PBS con 0,05% de Tween-20. Las microcápsulas se añadieron a los pocillos recubiertos con antígeno o de control y se permitió que se unieran durante 1 hora. Las microcápsulas no unidas se retiraron lavando cinco veces con PBS con 0,05% de Tween-20. Los fondos de los pocillos de la placa de ELISA se analizaron en busca de microcápsulas unidas en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon). Las microcápsulas se contaron usando un programa informático para el análisis de imágenes Volocity (Perkin Elmer). Un filtro DAPI se utilizó para visualizar las microcápsulas Uvitex. Una iluminación con LED blanco e imágenes de campo brillante se emplearon para las microcápsulas de lambda cihalotrina. Los controles para las microcápsulas que contenían lambda cihalotrina o Uvitex incluían microcápsulas en blanco y microcápsulas a las que se había acoplado VHH no relacionado.

Tabla 5: Microcápsulas unidas a pocillos recubiertos con lectina de patata o antígeno no relacionado

		Recuento	Recuento	Recuento	Área	Área
		Microcápsulas que contienen lambda-cihalotrina			Microcápsulas que contienen Uvitex OB	
	Cobertura de la superficie	Microcápsulas en blanco	control no relacionado	VHH 3E6	VHH 3E6	control no relacionado
sin recubrimiento	100%	583	689	7.910	86.574	82.757
lectina de patata	100%	755	828	4.550	504.839	16.676
lectina de patata	20%	616	709	798	510.242	35.433
lectina de patata	4%	408	348	209	144.955	7.529
sin recubrimiento	100%	n.d.	n.d.	861	68.181	60.841
antígeno no relacionado	100%	n.d.	n.d.	601	84.508	94.153
antígeno no relacionado	20%	n.d.	n.d.	386	47.906	39.218
antígeno no relacionado	4%	n.d.	n.d.	7.910	23.525	18.517

En otro experimento también se determinaron analíticamente las cantidades de lambda cihalotrina. Se añadieron 100 µl/pocillo de acetona a pocillos lavados con microcápsulas unidas y se transfirieron a viales de vidrio con 10 ml de hexano que contenía 0,05% de fosfato de trifenoilo como patrón interno. La cantidad de lambda cihalotrina se determinó mediante un análisis GC/MS-MS en comparación con soluciones de calibración. Los controles para las microcápsulas de lambda cihalotrina incluían microcápsulas en blanco a las que no se acoplaron los VHH y microcápsulas a las que se acoplaron VHH no relacionados. Los controles también incluían pocillos que no se recubrieron con goma arábiga o lectina de patata. Basándose en los resultados del ensayo similar a ELISA con microcápsulas de lambda cihalotrina, se encontró que algunos de los VHH de esta invención (por ejemplo, VHH3E6) eran capaces de unirse y retener microcápsulas en superficies recubiertas con antígeno, dando lugar a un aumento de 23 veces más en la cantidad de lambda cihalotrina en los pocillos recubiertos con antígeno en comparación con las microcápsulas en blanco, y se midió un aumento de 27 veces más sobre los pocillos en blanco no recubiertos con antígeno.

Basándose en los resultados de los ensayos de unión a microcápsulas, los VHH se podían clasificar como capaces o no capaces de unirse y retener microcápsulas en una superficie. Algunos de los VHH de esta invención (por ejemplo VHH3E6) mostraron ser capaces de unirse específicamente a las superficies recubiertas con antígeno cuando se acoplaban a una microcápsula. No se observó una unión significativa a superficies con antígenos no relacionados. Por otra parte, la unión específica era lo suficientemente fuerte para retener la microcápsula en la superficie recubierta con antígeno, ya que la fuerza de la unión resiste claramente las fuerzas de cizallamiento que se producen durante el procedimiento de lavado. Adicionalmente, los VHH son capaces de unirse y retener microcápsulas que contienen ingredientes activos relevantes en las superficies, tal y como se muestra para el ejemplo con microcápsulas que contienen el insecticida lambda cihalotrina.

A continuación, se investigó si la unión de las microcápsulas a superficies se podía mejorar mediante el uso de agentes de direccionamiento que comprendían VHH multivalentes. Se realizó una serie de acoplamientos paralelos con cantidades iguales de VHH monovalente, VHH bivalente y VHH no relacionado. El éxito del acoplamiento de VHH y VHH multivalente se analizó como se describe en el ejemplo 4. Un ensayo similar a ELISA se realizó usando microplacas de área media de unión elevada (Greiner Bio-One) recubiertas con 5 µg/pocillo de lectina de patata. Los

pocillos de control incluían pocillos en blanco o pocillos recubiertos con antígenos no relacionados. Las placas se lavaron tres veces con PBS con 0,05% de Tween-20 y se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS durante 1 a 2 horas. Las microcápsulas que contenían Uvitex acopladas a VHH se diluyeron hasta densidades apropiadas en 1% de leche desnatada en PBS con 0,05% de Tween-20. Se prepararon series de diluciones de 5 veces y se permitió que se unieran a la superficie para comparar la unión de las microcápsulas acopladas con VHH monovalente o bivalente. Las microcápsulas se añadieron a los pocillos recubiertos con antígeno o de control y se permitió que se unieran durante 1 hora. Las microcápsulas no unidas se eliminaron lavando cinco veces con PBS con 0,05% de Tween-20. Los fondos de los pocillos de la placa de ELISA se analizaron en busca de microcápsulas unidas en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon). Las microcápsulas se contaron usando un programa informático de análisis de imágenes Volocity (Perkin Elmer). Un filtro DAPI se utilizó para visualizar las microcápsulas Uvitex. Los VHH bivalentes mostraron ser capaces de unirse específicamente a una superficie recubierta con antígeno cuando se acoplaban a una microcápsula y se retuvieron varias microcápsulas usando VHH bivalente, en comparación con microcápsulas con VHH monovalente. Con la densidad más alta de microcápsulas aplicadas (calculada para cubrir totalmente la superficie del fondo del pocillo) se encontró que se retenía un 17% más de microcápsulas con los VHH bivalentes acoplados en el pocillo, en comparación con la misma cantidad de microcápsulas con VHH monovalentes. Con una aplicación de 25 veces menos de microcápsulas se encontró que se retenía un 160% más de microcápsulas en el pocillo para las microcápsulas acopladas con VHH bivalentes, en comparación con las microcápsulas con VHH monovalente. El área superficial de las microcápsulas con VHH bivalentes acoplados era 15 veces superior al área superficial de las microcápsulas en blanco aplicadas con esa densidad de microcápsulas, mientras que el área superficial de las microcápsulas con VHH monovalentes era solo 6 veces superior al área superficial de las microcápsulas en blanco aplicadas con esa densidad de microcápsulas. Esta diferencia podría explicarse por un aumento en la fuerza de la unión debido a una avidéz adicional de los VHH bivalentes en comparación con los VHH monovalentes, también podría ser que el uso de VHH bivalentes incrementa la flexibilidad y la longitud del espaciador de los agentes de direccionamiento acoplados sobre las microcápsulas, o una combinación de ambos.

Tabla 6: Áreas superficiales de microcápsulas unidas a pocillos recubiertos con lectina de patata o antígeno no relacionado

	cobertura de la superficie	VHH 3E6 monovalente	VHH 3E6 bivalente	VHH no relacionado	microcápsulas en blanco
sin recubrimiento	100%	74.536	66.176	77.014	84.982
lectina de patata	100%	415.773	490.546	141.636	90.030
lectina de patata	20%	307.478	511.303	43.452	44.024
lectina de patata	4%	59.377	155.759	19.170	10.599
sin recubrimiento	100%	72.036	55.841	68.109	66.509
antígeno no relacionado	100%	69.503	45.677	78.205	50.965
antígeno no relacionado	20%	27.742	22.114	30.459	17.831
antígeno no relacionado	4%	5.011	15.038	19.755	6.279

Un ensayo de unión de disco de hoja se utilizó para evaluar la interacción de las microcápsulas acopladas con VHH con hojas de patata, césped y azalea. Se tomaron muestras de discos de hojas con 8 mm de ϕ de las hojas de plantas de patata en maceta (variedad Desirée), de las hojas de *Lolium perenne* cultivado en invernadero y de las hojas de plantas de azalea en maceta. Los discos de hojas se lavaron tres veces con PBS. Las microcápsulas que contenían lambda cihalotrina o Uvitex se diluyeron hasta las densidades apropiadas en 1% de leche desnatada en PBS con 0,05% de Tween-20. Las microcápsulas se añadieron a los discos de hojas y se permitió que las microcápsulas se sedimentaran y la unión de agentes de direccionamiento durante 1 hora. Las microcápsulas no unidas se eliminaron lavando tres a cinco veces con PBS con 0,05% de Tween-20.

Para las microcápsulas con lambda cihalotrina se realizó un análisis de residuos para medir las cantidades de lambda cihalotrina sobre discos de hojas de patata. Los discos de hojas lavados con microcápsulas unidas se transfirieron a viales de vidrio y las microcápsulas se disolvieron en acetona. Las muestras se diluyeron mediante la adición de hexano que contenía 0,05% de fosfato de trifenilo como patrón interno. La cantidad de lambda cihalotrina se determinó por análisis GC/MS-MS en comparación con las soluciones de calibración. Los controles para las microcápsulas de lambda cihalotrina incluían microcápsulas en blanco a las que no se acoplaron los VHH y microcápsulas a las que se acoplaron VHH no relacionados. Basándose en los resultados de los ensayos de unión de discos de hojas con microcápsulas de lambda cihalotrina, se encontró que algunos de los VHH de esta invención son capaces

de unirse y retener microcápsulas en las superficies de las hojas dando lugar a un aumento de 3,3 veces y 2,2 veces más de las cantidades de lambda cihalotrina sobre los discos de hojas, en comparación con las microcápsulas en blanco a las que no se acoplaron los VHH o las microcápsulas con VHH acoplados no relacionados, respectivamente.

Se analizaron los discos de hojas con microcápsulas Uvitex en busca de microcápsulas unidas en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon). Las microcápsulas se contaron usando un programa informático de análisis de imágenes Volocity (Perkin Elmer). Se utilizó un filtro DAPI para visualizar las microcápsulas Uvitex. Los controles para las microcápsulas Uvitex incluían microcápsulas en blanco a las que se no se habían acoplado los VHH y microcápsulas a las que se habían acoplado VHH no relacionados. Basándose en los resultados del ensayo de unión disco de hoja con microcápsulas Uvitex, se encontró que algunos de los VHH (por ejemplo VHH 3E6) de esta invención eran capaces de unirse y retener microcápsulas específicamente en las superficies de las hojas.

Sobre los discos de hojas de patata, la unión específica de las microcápsulas acopladas con VHH 3E6, dio lugar a 9 veces más microcápsulas unidas a las superficies de las hojas que en comparación con las microcápsulas en blanco y a 6 veces más microcápsulas unidas a las superficies de las hojas que en comparación con las microcápsulas acopladas con VHH no relacionados, como se muestra en la Figura 4. Sobre los discos de hojas de césped, la unión específica de las microcápsulas acopladas con VHH 3E6 dio lugar a 3 veces más microcápsulas unidas a las superficies de las hojas que en comparación con las microcápsulas en blanco y a 2 veces más microcápsulas unidas a las superficies de las hojas que en comparación con las microcápsulas acopladas con VHH no relacionados. En los discos de hojas de azalea, no se pudo observar una unión específica de las microcápsulas acopladas con VHH 3E6, lo que es completamente similar a la especificidad de la unión relacionada con la especie de planta de los VHH, como se ha mostrado en el ejemplo 3.

Un experimento de titulación se realizó para investigar qué factor de dilución de las microcápsulas con VHH específicos se corresponde a una aplicación de las microcápsulas en las que no se acoplaron VHH para obtener cantidades similares de microcápsulas después de un tratamiento idéntico. Se prepararon diluciones dobles en serie de microcápsulas y se analizó la unión de los discos de hoja sobre discos de hojas de patata para estas series de diluciones. A partir del experimento de dosificación se calculó que una concentración 8 veces menor de microcápsulas con VHH específicos daba lugar a cantidades similares de microcápsulas unidas específicamente a los discos de hoja, en comparación con las microcápsulas no funcionalizadas como se muestra en la Figura 5. A partir de este experimento, será evidente que se puede lograr una reducción significativa de una dosis adecuada de un producto agroquímico, mediante el acoplamiento de uno de los VHH de acuerdo con esta invención, con un microvehículo que contiene el producto agroquímico.

Ejemplo 6: Depósito y retención de microcápsulas acopladas a agentes de direccionamiento en la superficie de plantas vivas intactas

Los efectos sobre el depósito y la retención de vehículos con agentes de direccionamiento acoplados se investigaron en experimentos con plantas de patata completa en macetas (variedad Desirée) cultivadas en invernaderos. Las microcápsulas acopladas con VHH específicos acopladas con VHH de control no relacionados o microcápsulas en blanco se aplicaron a múltiples hojas compuestas enteras de diferentes plantas. En total se utilizaron 15 plantas para diferentes tratamientos. Se calcularon suspensiones de microcápsulas para aplicar una cobertura de 6,4% de microcápsulas en las superficies de las hojas. Las hojas compuestas se sumergieron en las suspensiones de microcápsulas de la misma manera que en los ensayos de unión de microcápsulas a discos de hojas (véase más arriba) con la modificación de que la sedimentación de las microcápsulas y la unión de VHH se permitió solo durante 15 minutos. Las plantas se dejaron secar durante 1 hora después de la aplicación de las microcápsulas. Se tomó una muestra de una de cada una de las parejas de hojas opuestas procedentes de cada hoja compuesta, y se analizó sin ningún tratamiento adicional. Los efectos de los VHH específicos acoplados a microcápsulas sobre el depósito de las microcápsulas se pudieron analizar con estas hojas desde diferentes aplicaciones. Las plantas enteras a las que solo faltaban las hojas de la muestra, se trataron adicionalmente para investigar el efecto de los VHH específicos acoplados a microcápsulas sobre la retención después de un evento de lluvia y los efectos combinados del depósito y la retención. Se empleó una simulación de lluvia con gotas finas (tipo de boquilla SSCOTFVS2) de 1 L/m² en 45 segundos para investigar los efectos de la retención. Las hojas opuestas de las hojas ya tomadas como muestra, se tomaron como muestras después de la simulación de lluvia. Las hojas enteras con microcápsulas Uvitex se analizaron en busca de microcápsulas unidas en un sistema de microscopio con macro zoom (Nikon). Las microcápsulas se contaron usando un programa informático de análisis de imágenes Volocity (Perkin Elmer). Un filtro DAPI se utilizó para visualizar las microcápsulas Uvitex. A partir de las hojas que se muestrearon antes del evento de lluvia, se calculó que entonces ya se habían depositado 2,7 más microcápsulas con un agente de direccionamiento específico que en comparación con las microcápsulas en blanco. Las hojas con microcápsulas con agente de direccionamiento de control no relacionado contenían solo una fracción de 0,8 de microcápsulas en comparación con las microcápsulas en blanco. Esto muestra que los VHH específicos ya tienen un efecto beneficioso sobre el depósito de microcápsulas en las plantas. Como promedio, un 69 (± 8)% de las microcápsulas con VHH específicos se retenía después del evento de lluvia, mientras que solo se retenía un 35 (± 17)% y un 39 (± 4)% de las microcápsulas para las microcápsulas acopladas con VHH de control no relacionado y las microcápsulas en blanco, respectivamente. La combinación de los efectos de depósito y retención daba lugar a un aumento de 5 y 0,9 veces en la cantidad de microcápsulas sobre las hojas de plantas completas para las microcápsulas con VHH específicos o con VHH de control no

relacionados, en comparación con las microcápsulas en blanco, respectivamente. A partir de este experimento estará claro que los VHH específicos son agentes de direccionamiento superiores que permiten una administración y una unión específica de los vehículos a las plantas vivas intactas enteras. Como consecuencia de la mejora del depósito y la retención, los agentes de direccionamiento de esta invención acoplados a vehículos que contienen un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, son muy prometedores para administrar dichos productos agroquímicos específicamente a las superficies de las plantas y de este modo aumentar las cantidades de dichos productos agroquímicos depositados sobre la superficie de una planta, o para permitir unas tasas de aplicación reducidas, manteniendo una eficacia similar, o permitir una frecuencia de aplicación reducida a la vez que se mantiene una eficacia similar, o una mayor resistencia a la lluvia de dichos productos agroquímicos o inducir una cierta especificidad para dichos productos agroquímicos o cualquier combinación de los anteriores.

Referencias

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

- Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. and Knox, J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 29321-29329.

- Calo, L., Garcia, I., Gotor, C and Romero, L.C. (2006). Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3- glucanase. *J. Exp. Botany* 57, 3911-3920.

- Cozens-Roberts, C., Quinn, J.A., Lauffenburger, D.A. (1990) Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. *Biophys. J.* 58, 857-872.

- Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *mAbs* 1, 26-28.

- Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 280-300.

- Jones, L., Seymour, G.B. and Knox, J.P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- β -D-galactan. *Plant Physiol.* 113, 1405-1412.

- Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. *FEBS J.* 275, 2684-2690.

- Lai, A., Cianciolo, V., Chiavarini, S and Sonnino, A. (2000). Effect of glandular trichomes on the development of *Phytophthora infestans* infection in potato (*S. tuberosum*). *Euphytica* 114, 165-174.

- Laus, M.C., van Brussel, A.A.N. and Kijne, J.W. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment and infection of vicia sativa root hairs. *Mol. Plant-Microbe interactions* 18, 533-538.

- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.

- Moller, I., Sorensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Obro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Bacic, A. and Willats, W.G. (2007). High throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *Plant J.* 50, 1118-1128.

- Nygren, P.-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.

- Pennell, R.I., Knox, J.P., Scofield, G.N., Selvendran, R.R. and Roberts, K. (1989). A family of abundant plasma membrane associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J. Cell. Biol.*, 108, 1967-1977.

- Scher, H.B., Rodson, M. and Lee, K-S (1998) Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Pestic. Sci.*, 54, 394-400.
- Schreiber, L. (2005) Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Ann. Bot.* 95, 1069-1073.
- 5 - Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.
- Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (2008) DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug is-cov. Today* 13, 695-701.
- 10 - Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A and Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognition* 7, 9-24.
- Underwood, W., Melotto, M. and He, S.Y. (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cellular Microbiol.* 9, 1621-1629.
- 15 - Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhiff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplin, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157-174.
- Willats, W.G. and Knox, J.P. (1999). Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Anal. Biochem.* 268, 143-146.
- 20 - Willats, W.G., Marcus, S.E. and Knox, J.P. (1998). Generation of monoclonal antibody specific to (A-5)-alpha-L-arabinan. *Carbohydr. Res.* 308, 149-152.
- Willats, W.G., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G-J.W.M., Voragen, A.G.J., Marcus, S.E., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S. and Knox, J.P. (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J. Biol. Chem.* 276, 19404-19413.
- 25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> VIB VZW VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL Jongedijk, Erik
- <120> ADMINISTRACIÓN ESPECÍFICA DE PRODUCTOS AGROQUÍMICOS
- 30 <130> VIBO/TRI/338
- <150> US 61/341,930
- < 151> 2010-04-06
- <150> EP 10159100.6
- < 151> 2010-04-06
- 35 <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- < 211> 123
- < 212> PRT
- 40 < 213> Lama glama

	<220> < 221> MISC_FEATURE < 223> 3A2
5	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (1)..(30) < 223> FR1
10	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (31)..(35) < 223> CDR1
15	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (36)..(49) < 223> FR2
20	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (50)..(66) < 223> CDR2
25	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (67)..(98) < 223> FR3
30	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (99)..(112) < 223> CDR3
35	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (113)..(123) < 223> FR4

ES 2 708 667 T3

<400> 1

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

Ser Leu Lys Val Ala Cys Ala Ala Ala Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Tyr
20 25 30

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

Ser Cys Thr Ser Ala Lys Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
100 105 110

Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 3B4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(98)

<223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Arg Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Phe Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Glu Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ser Trp Gly Thr Tyr Val Gly Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 3
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 3B7

20

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

25

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

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 3
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ile Glu Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ser Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 4
 < 211> 123
 < 212> **PRT**
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 3D10

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

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

5

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

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

25

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Arg Leu Arg Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Gly Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ser His Trp Gly Thr Tyr Val Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 5
 < 211> 123

ES 2 708 667 T3

```

< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
5 < 223> 3D2

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

10 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

15 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

20 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

25 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

30 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 5
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Leu Val Leu Tyr
20 25 30

```

ES 2 708 667 T3

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

Ser Cys Ser Ser Val Asn Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Leu Phe Arg Asp Asn Gly Ala Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 6
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

10

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 3D8

15

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

20

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

25

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

30

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

35

<220>
< 221> MISC_FEATURE

ES 2 708 667 T3

< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ala Tyr Tyr
20 25 30

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

Ala Cys Ile Ser Ala Leu Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Arg Met Thr Tyr Leu Ser Tyr
100 105 110

Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 7
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

10 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 3E6

15 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

20 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

25 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

30 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

<220>
< 221> MISC_FEATURE

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

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Arg Trp Tyr
20 25 30
Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45
Ala Cys Ile Ser Ala Leu Gln Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Gln Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Thr Asp Cys Asp Asp Ser Ser Arg Met Thr Tyr Thr Ser Tyr
100 105 110
Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 3F5

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

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

<220>
< 221> MISC_FEATURE

< 222> (36)..(49)
 < 223> FR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Phe Ser Leu Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Ala Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Thr Ser Val Asn Asp Gly Ser Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ala Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Val Thr Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 9
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 3F7

<220>
 < 221> MISC_FEATURE

ES 2 708 667 T3

< 222> (1)..(30)
 < 223> FR1

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

10
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (36)..(49)
 < 223> FR2

15
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

20
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

25
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

30
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ile Glu Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ser Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

	<210>	10	
	<211>	123	
	<212>	PRT	
	<213>	Lama glama	
5	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<223>	3F9	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
10	<222>	(1)..(30)	
	<223>	FR1	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(31)..(35)	
15	<223>	CDR1	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(36)..(49)	
	<223>	FR2	
20	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(50)..(66)	
	<223>	CDR2	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
25	<222>	(67)..(98)	
	<223>	FR3	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
30	<222>	(99)..(112)	
	<223>	CDR3	
	<220>		
	<221>	MISC_FEATURE	
	<222>	(113)..(123)	
35	<223>	FR4	
	<400>	10	
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		

ES 2 708 667 T3

Pro Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ala Tyr Tyr
20 25 30

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

Ala Cys Ile Ser Ala Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Asp Thr Thr Ser Arg Met Thr Tyr Leu Ser Tyr
100 105 110

Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 3G2

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

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

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

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

<220>
< 221> MISC_FEATURE

5 <222> (99)..(112)
 <223> CDR3

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(123)
 <223> FR4

 <400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

 Ser Cys Thr Ser Ser Pro Ser Gly His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ala His Trp Gly Thr Trp Val Asn Tyr
 100 105 110

 Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 10 <210> 12
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Lama glama

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 3G4

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

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(49)
 <223> FR2

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 708 667 T3

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

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 10 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

 15 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 Ser Cys Ser Ser Val His Gly Ala Arg Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ser Trp Gly Thr Tyr Ile Ser Trp
 100 105 110

 His Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 13
 < 211> 123
 < 212> PRT
 20 < 213> Lama glama

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 3H10

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 25 < 222> (1)..(30)
 < 223> FR1

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE

< 222> (31)..(35)
 < 223> CDR1

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 222> (36)..(49)
 < 223> FR2

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 10 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 15 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 20 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Val Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Asp Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Ile Gly Tyr
 25 100 105 110

 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 14
 < 211> 123
 < 212> PRT
 30 < 213> Lama glama

ES 2 708 667 T3

```

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 3H8

5
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Leu Val Leu Tyr
          20          25          30

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

```

ES 2 708 667 T3

Ser Cys Ser Ser Val Asn Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Phe Arg Asp Asn Gly Ala Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5
<210> 15
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 4A1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

35
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

ES 2 708 667 T3

<400> 15

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

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

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

Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ala Asn Trp Gly Thr Tyr Val Ser Tyr
100 105 110

Tyr Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 5B5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(98)

<223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Val Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Ser Val His Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 17
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 5B6

20

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

25

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

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Val Ser Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Gln Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 18
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 5C4

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

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

5

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

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

25

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Ala Gly Lys Glu Arg Glu Pro Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Thr Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 19
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

ES 2 708 667 T3

```

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 5C5

5
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

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

```

ES 2 708 667 T3

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

Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Val Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asp Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Ile Gly Tyr
100 105 110

Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 20
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 5D4

10

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

15

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

20

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

25

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

30

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

35

<220>
< 221> MISC_FEATURE

ES 2 708 667 T3

< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Met Arg Arg Phe
20 25 30

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

Ser Cys Ser Asn Val His Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Thr Asn Asp Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Val Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ala Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
100 105 110

Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 21
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

10 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 5E5

15 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

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

20 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

25 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

<220>
< 221> MISC_FEATURE

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

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ala Met Arg Arg Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Val Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val His Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Tyr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Val Arg Asp Asp Thr Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ala Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 22
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

20

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

25

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE

< 222> (36)..(49)
 < 223> FR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Leu Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Asp Ser Val Asp Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Lys Ala Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 23
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 5G2

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

5

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

10

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

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ile Glu Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Thr Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ser Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

	<210> 24
	< 211> 123
	< 212> PRT
	< 213> Lama glama
5	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 223> 5G5
10	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (1)..(30)
	< 223> FR1
15	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (31)..(35)
	< 223> CDR1
20	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (50)..(66)
	< 223> CDR2
25	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (67)..(98)
	< 223> FR3
30	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (99)..(112)
	< 223> CDR3
35	<220>
	< 221> MISC_FEATURE
	< 222> (113)..(123)
	< 223> FR4
	<400> 24
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 708 667 T3

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Ser Leu Arg	Tyr Phe
	20	25	30
Gly Ile Gly	Trp Phe Arg Gln Ala Ala	Gly Lys Glu Arg Glu Gly	Ile
	35	40	45
Ser Cys Ser	Asn Val Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val	
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Met	Leu Tyr	
	65	70	80
Leu Gln Met	Asn Asn Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys		
	85	90	95
Ala Thr Thr	Asp Cys Glu Ala Thr Thr Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr		
	100	105	110
Phe Gly Gln	Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	

5

<210> 25

< 211> 123

< 212> PRT

< 213> Lama glama

10

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 223> 5H5

15

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (1)..(30)

< 223> FR1

20

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (31)..(35)

< 223> CDR1

25

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (36)..(49)

< 223> FR2

25

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (50)..(66)

< 223> CDR2

25

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (67)..(98)

< 223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 25
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Glu Gly Phe Ala Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Arg Ile
 35 40 45
 Ser Cys Ser Ser Val Arg Asp Asn Gly Pro Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Arg Asn Ala Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Met Ser Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 26
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 7A2

20

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

25

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

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Thr Ser Val Pro Asn Gly His Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Val Arg Asp Asn Ala Gly Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Asn Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ala His Trp Gly Thr Trp Val Asn Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 27
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 7C2

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

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

5

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

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

25

<400> 27
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Phe Gly Phe Ala Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Arg Val
 35 40 45
 Ser Cys Asp Ser Val Asp Asp Gly Ser Thr His Tyr Ser Asn Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ile Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Thr Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 28
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

ES 2 708 667 T3

```

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 7D2

5
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Lys Val Ala Cys Ala Ala Ala Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Tyr
          20          25          30

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

```

ES 2 708 667 T3

Ser Cys Thr Ser Ala Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
100 105 110

Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

5
<210> 29
< 211> 123
< 212> PRT
< 213> Lama glama

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 7E1_1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

35
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

ES 2 708 667 T3

<400> 29

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

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

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

Ser Cys Ser Ser Val Arg Asp Asn Gly Pro Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Arg Asn Thr Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu His Met Ser Asn Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 7F1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(98)

<223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 30
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Val Ala Cys Ala Ala His Gly Phe Ser Leu Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Ala Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Thr Ser Val Asn Asp Gly Thr Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ala Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 31
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 8B10

20

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

25

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

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Pro Leu Gly Leu Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Ser Val His Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Phe Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Ser Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 32
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 8B12

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

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

5

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

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

25

<400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Val Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Cys Ile Ser Ala Leu Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Arg Met Thr Tyr Leu Ser Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 33
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

ES 2 708 667 T3

```

<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 223> 9A1

5
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(30)
< 223> FR1

10
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (31)..(35)
< 223> CDR1

15
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (36)..(49)
< 223> FR2

20
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (50)..(66)
< 223> CDR2

25
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (67)..(98)
< 223> FR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (99)..(112)
< 223> CDR3

30
<220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (113)..(123)
< 223> FR4

<400> 33
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Phe Tyr Tyr

```

ES 2 708 667 T3

	20	25	30
	Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val		
	35	40	45
	Ala Cys Ile Ser Ala Leu Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val		
	50	55	60
	Glu Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys		
	85	90	95
	Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Ala Ser Arg Met Thr Tyr Thr Ser Tyr		
	100	105	110
	Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
5	<210> 34 < 211> 123 < 212> PRT < 213> Lama glama		
10	<220> < 221> MISC_FEATURE < 223> 9B5		
15	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (1)..(30) < 223> FR1		
20	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (36)..(49) < 223> FR2		
25	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (50)..(66) < 223> CDR2		
30	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (67)..(98) < 223> FR3		
30	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (99)..(112) < 223> CDR3		

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

5

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu His Glu Gly Ile
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Thr Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 9C4

15

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

20

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

25

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ser Cys Ile Ser Ala Leu His Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ala Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 36
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 9D5

25

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

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

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

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly His Gly Phe Gly Val Ala Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Ser Cys Asp Ser Val Asp Asp Gly Thr Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Phe Arg Asp Asn Tyr Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Arg Ser Trp Gly Thr Trp Ile Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25

<210> 37
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

30

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 9E1

ES 2 708 667 T3

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

5

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

10

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

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 37
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Arg Leu Arg Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Gly Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Tyr Val Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

	<210> 38 < 211> 123 < 212> PRT < 213> Lama glama
5	<220> < 221> MISC_FEATURE < 223> 9E4
10	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (1)..(30) < 223> FR1
15	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (31)..(35) < 223> CDR1
20	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (36)..(49) < 223> FR2
25	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (50)..(66) < 223> CDR2
30	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (67)..(98) < 223> FR3
35	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (99)..(112) < 223> CDR3
	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (113)..(123) < 223> FR4

ES 2 708 667 T3

<400> 38

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

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

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

Ser Cys Ser Ser Val His Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Gly Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 9F4

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(30)

<223> FR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(49)

<223> FR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(98)

<223> FR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Leu Ser Val Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Leu Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Ser Val His Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Ser Ser Trp Gly Thr Trp Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 40
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 9H1

20

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

25

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

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

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

<400> 40
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Met Arg Arg Phe
 20 25 30
 Gly Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ser Cys Ser Asn Val His Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Thr Asn Asp Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Val Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Glu Ala Thr Ala Trp Gly Thr Tyr Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 41
 < 211> 123
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 223> 9H2

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

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

5

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

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (50)..(66)
 < 223> CDR2

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (67)..(98)
 < 223> FR3

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (99)..(112)
 < 223> CDR3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (113)..(123)
 < 223> FR4

25

<400> 41
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Val Ala Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Cys Ile Ser Ala Leu Arg Asp Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Thr Asp Cys Asp Ala Thr Ser Arg Met Thr Tyr Leu Ser Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 42
 < 211> 124
 < 212> PRT
 < 213> Lama glama

ES 2 708 667 T3

<400> 42
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Lys Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ser Ser Tyr Ala Tyr Asn
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 43
 gtcctggctg ctctctaca agg 23

<210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 44
 cctggctgct ctctacaag gtg 23

<210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 45
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 46
 < 211> 29
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Cebador

<400> 46
 gatgtgcagc tgcaggagtc tggrrggagg 29

10

<210> 47
 < 211> 35
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cebador

15

<400> 47
 ggacmarcadortgc ggccgctgga gacggtgacc tgggt 35

<210> 48
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

20

<220>
 < 223> Cebador

<400> 48
 ttatgcttcc ggctcgtatg 20

25

<210> 49
 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cebador

30

<400> 49
 ccacagacag ccctcamarcador 19

<210> 50
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

35

<220>
 < 223> Enlazador

<400> 50
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

40

<210> 51
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Marcador

<400> 51
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

5 <210> 52
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

10 <220>
 < 223> Marcador

<400> 52
 His His His His His His
 1 5

15 <210> 53
 < 211> 23
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Secuencia C-terminal de una estructura artificial bivalente de VHH

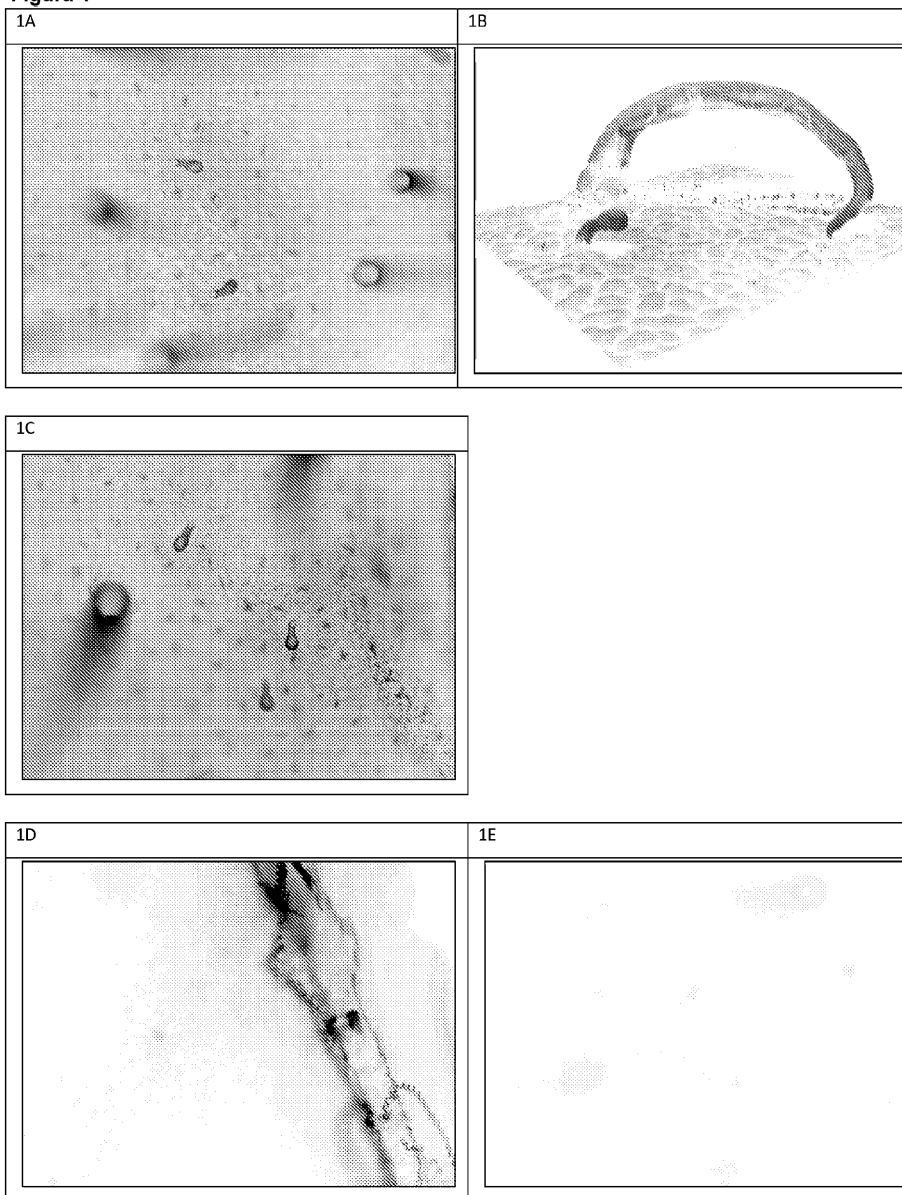
<400> 53
 Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
 1 5 10 15

20 Ala His His His His His His
 20

REIVINDICACIONES

1. Un agente de direccionamiento, que comprende al menos un dominio de unión capaz de unirse a al menos un sitio de unión sobre una superficie vegetal, en donde dicho dominio de unión es un VHH, o cualquier fragmento adecuado del mismo, en donde el agente de direccionamiento está acoplado a al menos un producto agroquímico, o a un vehículo que comprende o está unido a al menos un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos, en donde el agente de direccionamiento es capaz de retener dicho producto agroquímico o vehículo sobre dicha superficie vegetal.
2. El uso de un agente de direccionamiento según la reivindicación 1, para administrar y retener un producto agroquímico o una combinación de productos agroquímicos en una planta y/o en una parte de una planta.
3. El uso según la reivindicación 2, en donde dicho producto agroquímico o combinación de productos agroquímicos se selecciona a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes o reguladores del crecimiento vegetal.
4. El uso de un agente de direccionamiento según la reivindicación 2, en donde dicho vehículo es un microvehículo.
5. El uso de un agente de direccionamiento según la reivindicación 4, en donde dicho microvehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en microcápsulas, microesferas, nanocápsulas, nanoesferas, partículas de polímero, partículas hechas a base de celulosa lignificada artificialmente, partículas de gel compuestas, partículas de resina iónica débil, células microbianas o fragmentos de las mismas.
6. Una composición, que comprende al menos un agente de direccionamiento según la reivindicación 1.
7. La composición según la reivindicación 6, en donde dicho agente de direccionamiento está acoplado covalentemente a dicho vehículo.
8. La composición según la reivindicación 6 o 7, en donde dicho producto agroquímico se selecciona a partir del grupo que consiste en herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, biocidas, fertilizantes, protectores, micronutrientes o compuestos reguladores del crecimiento vegetal.
9. La composición según la reivindicación 7 u 8, en donde dicho vehículo se selecciona a partir del grupo que consiste en microcápsulas, microesferas, partículas de polímero, partículas hechas a base de celulosa lignificada artificialmente, partículas de gel compuestas, partículas de resina iónica débil, células microbianas o fragmentos de las mismas.

Figura 1



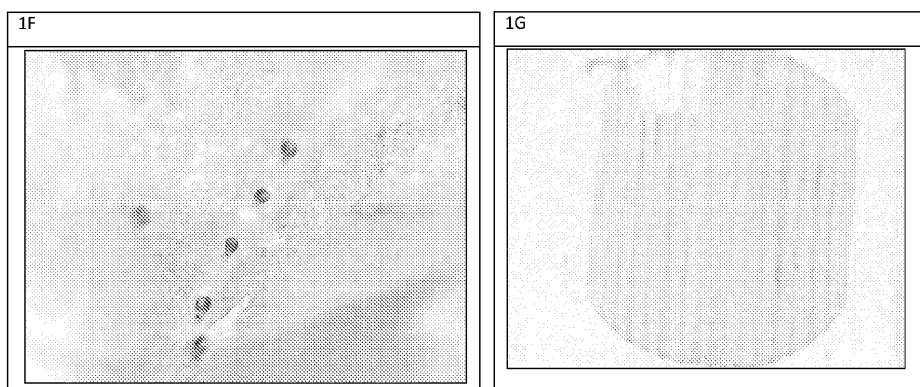


Figura 2

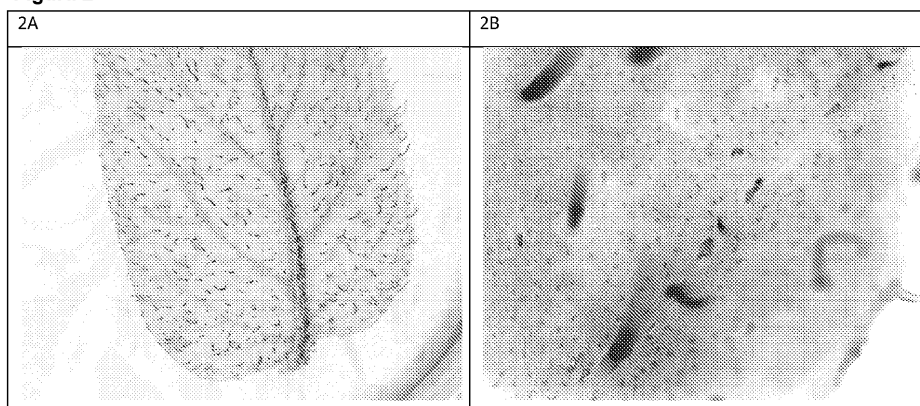


Figura 3

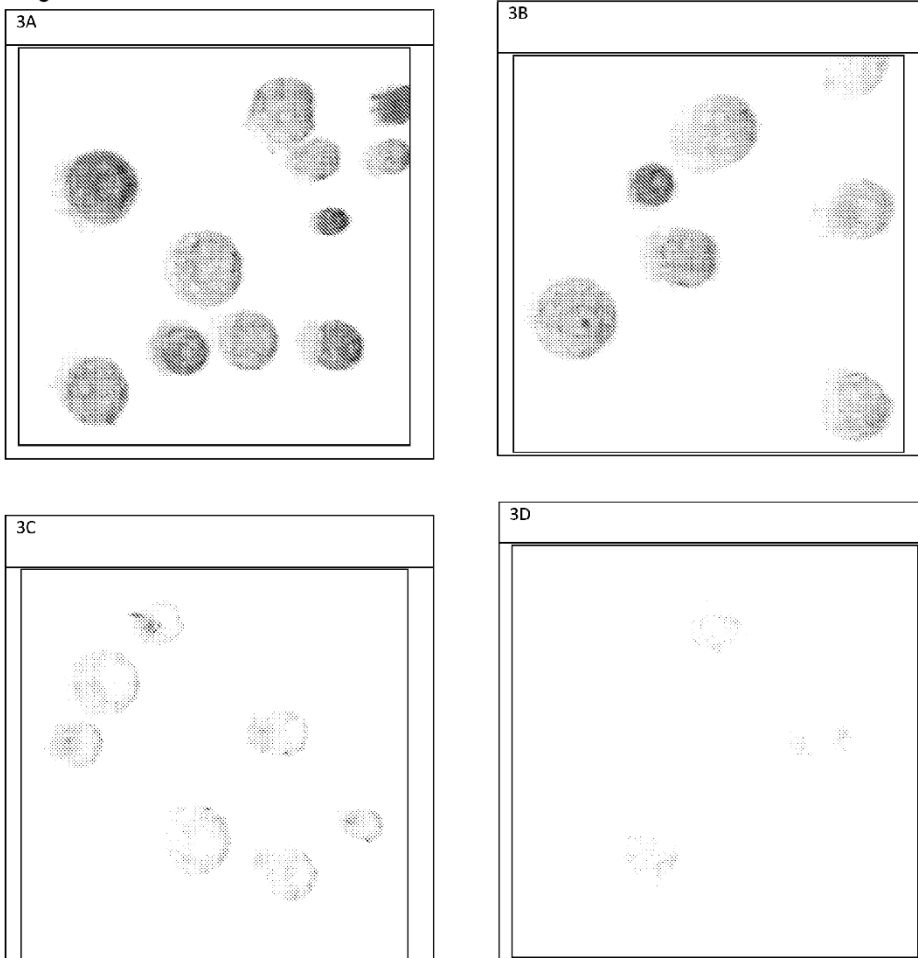


Figura 4

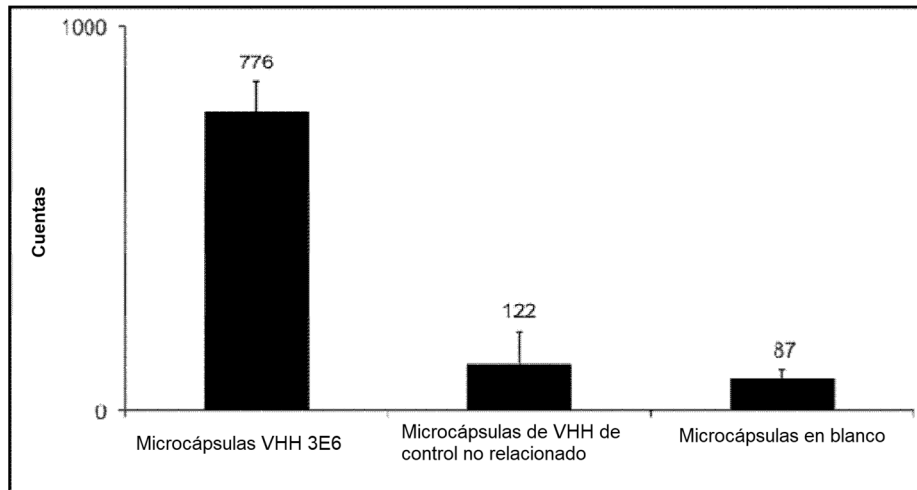


Figura 5

