(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
27 de marzo de 2014 (27.03.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/044892 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070653

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de septiembre de 2013 (19.09.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201231466
21 de septiembre de 2012 (21.09.2012) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT - Edificio 11 y 12, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA** [ES/ES]; Juan de Quesada, 30, E-35001 Las Palmas De Gran Canaria (ES).

(72) Inventores: **ORZÁEZ CALATAYUD, Diego Vicente**; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Primo Yúfera (IBMCP), Campus Universidad Politécnica, Avenida Los Naranjos, s/n, E-46022 Valencia (ES). **JULVE PARREÑO, José Manuel**; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Primo Yúfera (IBMCP), Campus Universidad Politécnica, Avenida Los Naranjos, s/n, E-46022 Valencia (ES). **GRANELL RICHART, Antonio**; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Primo Yúfera (IBMCP), Campus Universidad Politécnica, Avenida Los Naranjos, s/n, E-46022 Valencia (ES). **SARRIÓN-PERDIGONES, Alejandro**; Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Primo Yúfera (IBMCP), Campus Universidad Politécnica, Avenida Los Naranjos, s/n, E-46022 Valencia (ES). **GUTIERREZ CABRERA, Carlos**; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Juan de Quesada, 30, E-35001 Las Palmas De Gran Canaria (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,

[Continúa en la página siguiente]

(54) **Title**: METHOD FOR THE PRODUCTION OF COMPLEX REPERTOIRES OF RECOMBINANT MOLECULES

(54) **Título** : MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE REPERTORIOS COMPLEJOS DE MOLÉCULAS RECOMBINANTES

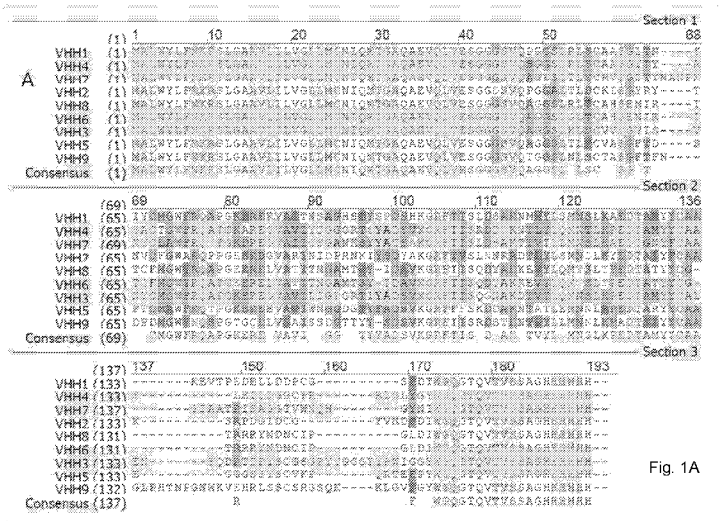


Fig. 1A

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for the production of complex repertoires of recombinant molecules in a consistent and reproducible manner, comprising the transient generation of multi-transgenic plants that generate somatic mosaics induced by viral replicons that are mutually exclusive. The invention also relates to the multi-transgenic plant or a fragment of same obtained in this way, as well as to extracts or purified fractions thereof, which represent complex repertoires of recombinant molecules, preferably recombinant proteins selected from among: enzymes, immunoglobulins, membrane receptors, intracellular receptors, lectins, polyclonal antibodies, antidotes based on anti-serums, immunological serums for passive immunity, and intravenous immunoglobulins.

(57) **Resumen**:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2014/044892 A1

NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

La presente invención describe un método de producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes de forma consistente y reproducible, mediante la generación de forma transitoria de plantas multi-transgénicas que dan lugar a mosaicos somáticos inducidos por replicones virales que se excluyen entre sí. La presente invención también hace referencia a la planta multi-transgénica o un fragmento de la misma así obtenida, así como a los extractos o fracciones purificadas de las mismas que representen repertorios complejos de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes seleccionadas entre: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, lectinas, anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE REPERTORIOS COMPLEJOS DE MOLÉCULAS RECOMBINANTES

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra dentro de la tecnología "biotecnología agrícola", siendo aplicable en la producción de conjuntos de moléculas recombinantes en los sectores químico, farmacéutico, veterinario y agrícola.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

En la actualidad existe una demanda creciente de moléculas recombinantes, para su uso en distintos sectores como el farmacéutico, veterinario, energético, etc. Muchas de estas proteínas requieren de sistemas eucariotas para su producción. En la mayoría de los casos, el objetivo último de la técnica es la producción de una única proteína de composición homogénea, como por ejemplo un factor de crecimiento o un anticuerpo monoclonal, y por ello la mayoría de los sistemas actuales están adaptados a este fin. Sin embargo no se dispone de metodologías que permitan producir repertorios complejos de proteínas diferentes de manera tal que la composición final de la mezcla sea altamente reproducible.

Algunos ejemplos de conjuntos complejos de proteínas que la industria produce y/o utiliza son los anticuerpos policlonales, las inmunoglobulinas hiperinmunes, los sueros inmunológicos para inmunidad pasiva o los antivenenos basados en antisueros. En todos los casos citados, el conjunto comprende, en todo o en parte, el repertorio de secuencias aminoacídicas que conforma la respuesta inmune de uno o varios individuos. La respuesta inmune de los mamíferos basa gran parte de su eficacia en el hecho de que comprende un amplio repertorio (policlonal) de inmunoglobulinas (anticuerpos) distintas. De esta forma diferentes inmunoglobulinas reconocen diferentes regiones del patógeno/antígeno/toxina garantizando una mayor adaptabilidad y capacidad de neutralización. Análogamente, los anticuerpos policlonales resultan más eficaces que los monoclonales en gran cantidad de aplicaciones terapéuticas, como la neutralización de toxinas y agentes infecciosos, o de diagnóstico como la detección de especímenes de

composición poco definida (Bregenholt et al., 2006; Dunman and Nesin, 2003; Haurum, 2006; Koefoed et al., 2006; Sharon et al., 2000).

A pesar de las ventajas inherentes a la policlonalidad, la producción de repertorios complejos de proteínas de forma recombinante ha sido poco abordada debido a su complejidad técnica. Prueba de ello es que en la actualidad los anticuerpos recombinantes comerciales son monoclonales. En aquellas aplicaciones donde es necesario el uso de repertorios complejos, como en el caso de anticuerpos policlonales para diagnóstico, los antivenenos basados en antisueros, las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias o las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva, se recurre a producirlos de forma tradicional (no recombinante), mediante inmunización y posterior aislamiento y purificación de sueros policlonales en animales (ratón, conejo, cabra o caballo, entre otros) o humanos.

Los anticuerpos policlonales, los antivenenos basados en antisueros y otros productos inmunológicos para inmunidad pasiva obtenidos a partir de animales inmunizados presentan los siguientes problemas: (i) plantean problemas éticos en su manufactura; (ii) tienen alta variabilidad entre lotes, debido a las diferencias de respuesta inmunológica de distintos individuos (iii) requieren una exhaustiva caracterización *de novo* en cada lote (iv) presentan riesgos de inmunogenicidad y transmisión inadvertida de patógenos cuando su uso es terapéutico.

Por su parte las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias y las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva se obtienen a partir de plasma sanguíneo de donantes humanos y su suministro es limitado. No existe alternativa recombinante en la actualidad.

Los problemas que presenta la obtención/producción/utilización de anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva obtenidos a partir de animales inmunizados, o las inmunoglobulinas intravenosas para el tratamiento de inmunodeficiencias y las inmunoglobulinas hiperinmunes para terapias de inmunización pasiva que se obtienen a partir de plasma sanguíneo de donantes humanos, se podrían solventar mediante la producción recombinante de repertorios complejos de anticuerpos policlonales. Sin embargo, existen numerosos

problemas técnicos que limitan esta posibilidad. Se han desarrollado algunas estrategias en este sentido basadas en animales transgénicos. Tal es el caso de los ratones transgénicos a los que se les ha introducido los loci de inmunoglobulinas humanas (US 6,111,166), los cuales pueden producir anticuerpos policlonales humanos mediante técnicas convencionales de inmunización. Sin embargo este sistema produce cantidades mínimas de anticuerpos debido al pequeño tamaño de los animales. También se han obtenido animales transgénicos de mayor tamaño como vacas (Kuroiwa et al., 2002).

Sin embargo los animales transgénicos tienen ciertos inconvenientes. En primer lugar, la inestabilidad de los loci de inmunoglobulinas compromete a largo plazo la producción de anticuerpos. En segundo lugar, es difícil eliminar las inmunoglobulinas del propio animal. En tercer lugar, los animales transgénicos no están exentos del riesgo de transmisión inadvertida de patógenos. Por último, la composición de la mezcla no es enteramente reproducible pues dependerá de las condiciones inmunofisiológicas del animal.

Una alternativa a los animales transgénicos consiste en producir anticuerpos policlonales recombinantes a partir de secuencias variables de inmunoglobulinas obtenidas de individuos con una respuesta inmune establecida, utilizando células de mamífero como plataforma de producción. Esta tecnología utiliza líneas celulares de mamíferos adaptadas para conseguir una integración sitio-específica de cada uno de los transgenes que constituyen la muestra (Bregenholt et al., 2006; Haurum, 2006; Klitgaard et al., 2006; Koefoed et al., 2011; Koefoed et al., 2006; Pedersen et al., 2010; Wiberg et al., 2006). Esto elimina la variabilidad de expresión debida al efecto posicional del transgén y facilita la producción de mezclas reproducibles de anticuerpos policlonales con alta consistencia lote a lote a escala industrial (WO 2004/061104).

Más recientemente se ha desarrollado un protocolo que mediante selección individual de clones estables de células de mamífero transformadas mediante inserciones al azar permite producir mezclas policlonales con reproducibilidad lote a lote (WO 2008/145133). Sin embargo, estas metodologías requieren un proceso laborioso de selección de clones individuales estables, por lo que es poco adecuada para mezclas policlonales de alta complejidad. Además los sistemas basados en células de mamífero tienen altos costes de inversión, producción, y escalado industrial, lo que hace atractivo el uso de plataformas alternativas que reduzcan los costes.

Un grupo de plataformas alternativas particularmente interesante son aquellas basadas en plantas. Las plantas se utilizan como biofactorías de proteínas de muy distinta índole utilizando para ello, entre otras metodologías, virus recombinantes (Orzaez et al., 2009). Existen numerosos ejemplos de virus vegetales que han sido adaptados a la producción de proteínas recombinantes en plantas (Gleba et al., 2004). Para ello el virus silvestre se somete a una serie de modificaciones tendentes a convertirlo en un vector viral, esto es, un ácido nucleico, generalmente de naturaleza plasmídica capaz de transferir a la célula unidades autoreplicativas que albergan la secuencia que codifica la proteína de interés. Una de las principales ventajas del uso de vectores virales es que su capacidad autoreplicativa permite amplificar el número de copias del transgen en la célula, lo que favorece la obtención de altísimos niveles de producción recombinante. En la actualidad existen numerosos vectores virales siendo explotados por laboratorios académicos y empresas biotecnológicas (por ejemplo WO 05/049839, WO 06/079546).

Hasta el momento, los vectores virales se han utilizado para la producción de productos homogéneos, como anticuerpos monoclonales, algunos de los cuales se encuentran en fases de ensayos clínicos. Un precedente en el intento de avanzar hacia la producción de mezclas policlonales de anticuerpos basándose en sistemas virales de plantas aparece en un trabajo desarrollado por Julve et al., 2011 (resumen de tesis de Máster, Universidad Politécnica de Valencia). En concreto, se hace referencia a la producción de una mezcla policlonal de Nanobodies (VHHs) usando hojas de *Nicotiana benthamiana.* Sin embargo la metodología resumida en Julve et al., 2011 es muy laboriosa ya que se basa en la expresión individualizada de cada anticuerpo en hojas distintas e independientes y su posterior mezcla y purificación conjunta dando lugar a una mezcla policlonal final. Por tanto, se trata de una estrategia basada en plantas mono-transgénicas que se mezclan posteriormente. La aproximación de Julve et al., 2011 no aporta procedimiento alguno para producir mezclas de proteínas recombinantes de complejidad alta o muy alta, ya que estas son inaccesibles a un método que no implique expresión simultánea.

Llevado de este único precedente, hasta la fecha no se han utilizado vectores virales para la producción simultánea de mezclas complejas de proteínas recombinantes, entre otras razones porque se considera que, según el modelo comúnmente aceptado de cuasiespecies, la competencia que tiene lugar entre los distintos clones que co-infectan una planta conduce al predominio de unos pocos clones sobre los demás. Es esperable

por tanto que la mezcla resultante tenga una composición singular y no reproducible, puesto que el concepto de "*competencia entre clones*" conduce al dominio de unas variantes sobre otras y por tanto a una escasísima reproducibilidad entre experimentos. El requerimiento de reproducibilidad sería muy ventajoso, ya que permitiría producir mezclas terapéuticas con composición constante lote a lote.

Por tanto, actualmente existe la necesidad de desarrollar un método para la producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes, basado en plantas y tejidos que cumplan los requisitos de "multi-trangénesis" (co-expresión de los distintos transgenes simultáneamente en forma de mosaico somático en un mismo tejido) y de reproducibilidad del sistema de expresión (producción de mezclas altamente reproducibles entre experimentos independientes).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método para la obtención de mezclas policlonales de moléculas recombinantes, de forma consistente y reproducible, mediante la generación de forma transitoria de plantas multi-transgénicas que dan lugar a mosaicos somáticos inducidos por replicones virales que se excluyen entre sí.

Las plataformas eucariotas actuales no ofrecen la posibilidad de producir repertorios complejos de proteínas, ya que están basadas en su mayoría en la introducción en el organismo recombinante de un único gen (o a lo sumo un grupo reducido de genes en el caso de proteína oligoméricas). La producción de mezclas policlonales presenta dificultades técnicas, que son distintas según el tipo de plataforma utilizada.

(i) En el caso de organismos completos, como animales o plantas transgénicas, el problema técnico consiste en la dificultad de transformar el genoma de forma estable con un número alto de secuencias similares. A esto hay que añadir la dificultad de controlar los niveles de expresión de cada gen individual integrado en el genoma, lo que dificulta la obtención de una mezcla definida.

(ii) En el caso de cultivos celulares, la competencia entre clones durante la fase de crecimiento del cultivo conduce a la pérdida de diversidad y por tanto a una escasa reproducibilidad. Una alternativa para obtener mezclas de composición

definida consiste en producir de forma separada los diferentes componentes de manera individualizada y realizar la mezcla *a posteriori*. Esto implica mantener líneas paralelas de producción y purificación, lo cual supone un coste creciente que resulta inviable cuando la complejidad de la mezcla alcanza un cierto umbral.

La presente invención está basada en un aspecto poco estudiado de la infección viral en plantas: la alta estructuración espacial de las variantes clonales producidas durante el curso de la infección (Elena et al., 2011; Sardanyes and Elena, 2011). Esta distribución espacial ocurre como consecuencia de la propia estructura anatómica de las plantas y está facilitada por un fenómeno conocido como "exclusión de la superinfección" o "interferencia homóloga". Este fenómeno consiste en que la presencia de un clon viral "residente" en una célula o grupo de células impide la superinfección de las mismas por un segundo clon viral "retador" altamente relacionado con el primero (Folimonova, 2012; Syller, 2012; Ziebell and Carr, 2010). Este fenómeno resulta especialmente evidente al infectar experimentalmente una planta con una mezcla compleja de variantes víricas. En este caso, las distintas variantes no entran en competencia entre todas ellas como cabría esperar, lo que daría lugar a una distribución homogénea liderada por el clon más apto. Por el contrario, cada variante coloniza una región de la planta excluyendo a las demás y dando lugar a una distribución espacial estructurada en mosaico que permite la convivencia en diferentes células de la misma planta de las diferentes variantes clonales.

Esta invención describe el aprovechamiento del fenómeno natural de "exclusión de la superinfección" o "interferencia homóloga" viral para la producción de conjuntos espacialmente delimitados de proteínas (mosaicos somáticos) que pueden dar lugar a mezclas policlonales de productos recombinantes de composición definida, reproducible y con altos rendimientos.

La invención hace uso de vectores virales derivados de un virus vegetal. Hasta ahora, la principal ventaja que confieren los vectores virales es que permiten alcanzar altos rendimientos de proteína recombinante. Esto es debido a su capacidad de auto-replicación, que conlleva a su vez la amplificación del gen que codifica la proteína recombinante a producir. Existen multitud de vectores virales descritos en la literatura del campo que se adaptan a esta descripción y que por tanto son utilizables para desarrollar el método de la invención. Dicho vector viral puede estar formado bien por un genoma viral completo o bien por un genoma viral del que se han eliminado partes superfluas,

pero que conserva las funciones básicas del virus silvestre, y como mínimo la función de autoreplicación, la función de movimiento célula a célula y la capacidad de ejercer "interferencia homologa" entre clones relacionados. Dicho vector viral ha de ser capaz además de incorporar de forma recombinante una secuencia de nucleótidos que codifique el o los genes de interés y de inducir su traducción a proteína en la célula huésped. Con la presente invención esa propiedad de interferencia homologa cobra tanta importancia como los altos niveles de producción.

En la presente invención, la producción de una mezcla formada por un número N de proteínas recombinantes distintas se realiza clonando en primer lugar los N genes que codifican las N proteínas de interés en una misma posición dentro del vector viral. El clonaje puede realizarse clon a clon de forma separada, o bien realizarse de forma conjunta en una sola reacción de clonación en el que se incluyen en una misma solución todas las variantes de genes de interés. Una vez generadas las N variantes clonales del vector viral, estas se transfieren de forma conjunta y simultánea a la planta huésped utilizando alguna de los distintas metodologías de transferencia de vectores virales accesibles en el estado del arte, en una dilución tal que se favorezca la entrada de un número medio entre cero y uno de entidades replicativas por célula huésped.

En una realización preferida pero no limitante de la presente invención, la transferencia de las N variantes clonales del vector viral a las células de la planta se realiza mediante transformación genética transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de un clon infectivo del virus, generando así una planta transitoriamente multi-transgénica. En estas circunstancias, en cada célula del huésped se replica mayoritariamente una o ninguna de las variantes clonales del vector viral. Como consecuencia de la función de movimiento célula a célula, y eventualmente de la función de movimiento sistémico del replicón viral, cada clon viral se desplaza desde la célula infectada inicialmente a células adyacentes y/o distantes que no hayan resultado a su vez infectadas primariamente por otro clon viral, amplificando allí su genoma y acumulando el producto del gen recombinante. Sin embargo, en virtud de la función de interferencia homóloga, cada clon viral queda excluido de aquellas células en las que exista una infección ya establecida por otro clon residente. Como consecuencia se obtiene una distribución estructurada en mosaico de los diferentes clones virales donde la abundancia relativa de cada clon está en función, entre otros parámetros, de su capacidad de trasladarse de célula a célula. La interferencia homóloga provoca una distribución estructurada en mosaico de la

variabilidad clonal que minimiza el efecto de competencia entre clones. Transcurrido el tiempo necesario para que se desarrolle un mosaico estable, se procede a la homogenización de la planta y a llevar a cabo los procesos de extracción y/o purificación convenientes en función de la naturaleza de las proteínas a producir, obteniéndose como resultado una mezcla compleja de proteínas recombinantes cuya composición es consistente y reproducible entre experimentos.

La población de proteínas recombinantes producidas cambia durante las primeras etapas de infección, pero dado un tiempo de incubación suficientemente largo para que se hayan colonizado todas las células de la planta, la abundancia relativa de cada proteína en la mezcla (Ci) está en función de los siguientes parámetros: (Vi) la velocidad de movimiento célula a célula de cada clon; (Pi) los niveles de producción de proteína específicos de cada clon; (ODRi) la abundancia relativa de cada clon en el inoculo inicial.

En principio, la co-existencia de dos o más clones en la misma célula hace necesario incluir un cuarto factor (Iij) que refleja en su caso el resultado de la interacción entre dos clones i y j cuando estos compiten por los recursos biosintéticos de la misma célula. Iij es un parámetro complejo, diferente para cada par ij. La complejidad del parámetro Iij hace que Ci resulte altamente variable e impredecible en sistemas sin interferencia homóloga. Sin embargo, en la metodología descrita en esta invención, la existencia de un fenómeno de interferencia homóloga disminuye al mínimo la interacción entre clones, permitiendo despreciar el parámetro Iij y por tanto facilitando la predictibilidad y reproducibilidad de la expresión de mezclas policlonales.

Por tanto el sistema descrito permite la producción de mezclas de complejidad alta o muy alta e incluso de mezclas de composición indefinida con altos rendimientos. El límite teórico de componentes distintos que puede comprender dicha mezcla es del mismo orden que número total de células empleadas en el proceso de producción. Dado que la metodología es escalable simplemente aumentando el número de plantas, la complejidad potencial de la mezcla es virtualmente ilimitada. Alternativamente, esta metodología puede utilizarse para la producción de una mezcla policlonal definida que comprenda N clones previamente seleccionados.

El requerimiento de reproducibilidad es muy ventajoso, ya que permitiría producir mezclas terapéuticas con composición constante lote a lote. El procedimiento de la invención da

lugar a mezclas cuya composición es altamente reproducible entre experimentos. La alta reproducibilidad de la expresión multitransgénica del procedimiento de la invención, se demuestra en los ejemplos, donde se describen experimentos en los que se ensayan mezclas de complejidad muy alta (>100 elementos). Se apunta que la posible razón de esta reproducibilidad es la puesta en acción de un fenómeno de interferencia homóloga, aunque este criterio es diferente al descrito en el estado de la técnica (actualmente no se ha establecido la conexión entre los fenómenos de interferencia homóloga y reproducibilidad) y por tanto constituye una alternativa válida a los métodos previos de producción de mezclas complejas de proteínas recombinantes.

Además de la citada reproducibilidad, el método de la invención tiene una aplicación importante en la producción de complejos multiprotéicos policlonales, ya que la interferencia homóloga impide la formación de complejos multiprotéicos distintos a los deseados. Así, cuando los clones a expresar forman homopolímeros, como homodímeros o homotetrámeros, la co-expresión de dos o más clones en una misma célula mediante los métodos tradicionales conduce a la formación de una mezcla inconsistente de heteropolímeros. En cambio el procedimiento de la invención favorece la formación preferente de homodímeros. Igualmente, el método de la invención facilita la expresión policlonal de mezclas de heteropolímeros de composición definida, como es el caso de los anticuerpos policlonales.

En este caso particular, cada cadena pesada tiene una cadena ligera acompañante. Al expresar mezclas policlonales en sistemas sin interferencia homóloga tiene lugar un fenómeno conocido como “barajado de cadenas”, por el cual cada cadena pesada se puede unir con cualquier cadena ligera distinta de su acompañante, dando lugar a un anticuerpo de actividad subóptima. El método de la invención permite minimizar el efecto de barajado de cadenas al minimizar la interferencia entre clones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención hace referencia a un método para la producción de al menos un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por comprender los siguientes pasos:

i) ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas en un vector viral

de destino derivado de un virus vegetal que en su mecanismo de infección presenta la propiedad conocida como "interferencia homóloga" o "exclusión de la superinfección", de forma tal que se genere una colección de clones virales;

ii) transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped o un órgano o tejido de una planta huésped que es susceptible de albergar la replicación y el movimiento del vector viral.

iii) generación de una planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático donde más del 80%, preferentemente más del 90%, de las células expresan exclusivamente una de las N moléculas recombinantes, o bien la expresan muy mayoritariamente, en una proporción molar que supone al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, del total de N moléculas recombinantes producidas en esa misma célula.

En una realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes. En este caso, el paso i) se caracteriza por ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas que corresponden a las secuencias codificantes de cada una de las N proteínas distintas que se quieren producir en formato policlonal, en un vector viral de destino derivado de un virus vegetal que en su mecanismo de infección presenta la propiedad conocida como "interferencia homóloga" o "exclusión de la superinfección", de forma tal que permita su traducción a proteínas, formándose una colección de clones virales. Así mismo, el paso ii) se caracteriza por la transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped o un órgano o tejido de una planta huésped que es susceptible de albergar la replicación y el movimiento del vector viral, así como la traducción de las N proteínas recombinantes.

En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que el vector viral de destino del paso ii) se encuentra en forma de un clon infectivo insertado en un vector binario y utiliza la transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens* como mecanismo de entrada en las células de la planta huésped generando así una planta multi-transgénica que expresa las N moléculas recombinantes, preferentemente N proteínas recombinantes, en forma de mosaico somático. Preferentemente, el vector viral está desprovisto de su función de movimiento

sistémico. Más preferentemente, el vector viral se hace llegar a las células de la planta huésped mediante un sistema mecánico. Aún más preferentemente, el sistema mecánico se selecciona de entre el siguiente grupo: infiltración a vacío, infiltración por sobrepresión y espray.

En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una variante de secuencia de una familia de proteínas. Preferentemente, la familia de proteínas se selecciona de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, y lectinas.

En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que es combinado con un sistema de expresión sin interferencia homóloga que permite la producción de proteínas heteromultiméricas donde algunos de los componentes del multímero son variables y se producen mediante el sistema con interferencia, mientras que otros componentes son constantes y se producen mediante el sistema no interferente.

En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina. Preferentemente, la inmunoglobulina es producida por linfocitos obtenidos a partir de animales inmunizados frente a un antígeno.

En otra realización preferente de la presente invención, el método anteriormente descrito se caracteriza por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina o su fragmento, seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes (phage display).

La presente invención hace referencia también al uso del método descrito anteriormente, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de homopolímeros.

Así mismo, la presente invención hace referencia también al uso del método descrito anteriormente para producir de forma recombinante una mezcla compleja de heteropolímeros donde cada célula produce un solo tipo de heteropolímero, minimizando

el efecto de “barajado de cadenas”.

La presente invención hace referencia también a una planta transitoriamente multi-transgénica o un fragmento de la misma, caracterizada por que es obtenida en el paso iii) del método descrito anteriormente, planta o fragmento de planta (órgano, tejido) transfectados con una colección de clones virales como la descrita en el paso ii) del método descrito en la reivindicación 1, y que expresa una mezcla policlonal de proteínas.

Preferentemente, la planta o el fragmento de la misma expresa en todo o en parte y de modo recombinante, al menos un repertorio complejo de anticuerpos policlonales. Más preferentemente, los anticuerpos policlonales son similares a los producidos por un animal o un grupo de animales en respuesta a un proceso de inmunización frente a un antígeno, un grupo de antígenos o un agente patógeno.

La presente invención hace referencia también a un extracto crudo obtenido de una planta descrita anteriormente.

Así mismo, la presente invención hace referencia también a una mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto crudo descrito anteriormente.

Por último, la presente invención hace referencia también a un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por que se produce mediante el método descrito anteriormente. Preferentemente, las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes. Más preferentemente, las N proteínas recombinantes se seleccionan de entre el siguiente grupo: anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

El método de la invención comienza con el clonaje de los fragmentos de DNA que codifican las proteínas recombinantes en un vector viral derivado de un virus de plantas como TMV, PVX, CTV, CMV o cualquier otro virus que presente la propiedad de interferencia homóloga.

En una realización particular de la técnica, el vector deriva de un virus de RNA de simple cadena. En otra realización particular el vector viral consiste en un virus de RNA de

simple cadena que mantiene en su genoma las funciones de replicación y de movimiento célula a célula pero que se le ha eliminado la función de movimiento sistémico. El movimiento sistémico, que tiene lugar a través de los haces vasculares, puede generar cuellos de botella en la extensión de los clones virales a lo largo de la planta, con lo que su supresión facilita la reproducibilidad de la técnica.

La transferencia de los fragmentos de DNA al vector viral se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas de ensamblaje de fragmentos de DNA accesibles al estado del arte, como digestión/ligación con enzimas de restricción tipo II, digestión/ligación cíclica con enzimas de restricción tipo IIS, recombinación sitio-específica, clonaje independiente de ligasa, recombinación homóloga o técnicas de ensamblaje por PCR.

Los fragmentos de DNA pueden incorporarse, bien de uno en uno, bien en grupo, generando una genoteca de vectores virales, cada uno comprendiendo una secuencia distinta.

En una realización particular de la técnica, los distintos fragmentos de DNA pueden codificar distintos anticuerpos completos comprendiendo distintas secuencias variables provenientes de humanos, de ratón, de camélidos o de otros mamíferos.

En otra realización particular los fragmentos de DNA pueden codificar fragmentos de anticuerpos del tipo scFv o VHH provenientes de humanos, de ratón, de camélidos o de otros mamíferos.

En otra realización particular, cada vector viral puede incorporar dos o más fragmentos de DNA en dos posiciones distintas de su genoma, codificando, por ejemplo, una cadena pesada de un anticuerpo y la correspondiente cadena ligera del mismo anticuerpo de forma que la co-expresión de ambas en la misma célula dé lugar a una combinación funcional.

En todos los casos, el resultado final será una colección de F clones del vector viral conteniendo fragmentos o combinaciones de fragmentos recombinantes de DNA que en su conjunto representan N secuencias distintas, donde N es cualquier valor entre 2 y F.

A continuación, los F clones virales comprendiendo N secuencias recombinantes distintas

son transferidos de forma conjunta y simultánea a las células vegetales de la planta huésped utilizando alguno de los mecanismos del estado del arte para inducir la formación de replicones virales. La planta huésped puede ser cualquier especie vegetal susceptible de albergar un replicón viral. Puede tratarse de una planta completa o un explanto de ésta como una hoja u otro órgano como un fruto o una raíz. En una realización particular, la planta huésped es una planta del género *Nicotiana*. En otra realización particular la planta huésped pertenece a la especie *Nicotiana benthamiana*.

En una realización particular, la transferencia conjunta de los distintos clones virales a las células de la planta huésped puede estar mediada por la bacteria *Agrobacterium.* Dicha bacteria es capaz de transferir a la célula vegetal un fragmento de DNA (T-DNA) que comprende el o los genes de interés, de forma que sean producidos por la célula vegetal. La transferencia es transitoria porque no requiere integración del T-DNA en el cromosoma de la célula, por tanto el T-DNA no se transfiere a la línea germinal y su expresión dura unos pocos días. En esta realización particular, los replicones virales pueden introducirse íntegramente dentro del T-DNA a transferir en forma de un DNA copia introducida en el T-DNA de la bacteria. De este modo, *Agrobacterium* funciona como lanzadera para transferir el replicón viral al interior de la célula.

Para obtener la producción policlonal de proteínas recombinantes utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como lanzadera, la genoteca de vectores virales ha de estar preferentemente integrada en un vector binario que contenga un T-DNA, de modo que la secuencia viral se encuentre bajo la regulación de un promotor que opera en la célula huésped. Cada uno de los clones de la colección de vectores binarios se transfiere, bien de uno en uno, bien de forma conjunta, a células *Agrobacterium tumefaciens*, generando una colección policlonal de cepas de *Agrobacterium*. Este proceso se puede bien realizar directamente, bien mediante un paso intermedio en *Escherichia coli* que facilite el proceso de trasformación. En este segundo caso, la genoteca se transfiere primero a células de *Escherichia coli*, dando lugar a una colección de colonias independientes. Posteriormente las colonias se crecen independientemente o de forma conjunta en condiciones que minimicen la pérdida de diversidad, aislándose a partir de dichas colonias la colección de plásmidos binarios. A partir de esta última preparación se procede a la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* para dar lugar a una colección “semilla” de *Agrobacterium*.

La colección "semilla" comprende uno o varios cultivos de *Agrobacterium* obtenidos a partir de la transformación inicial de la colección de plásmidos binarios en una preparación de células competentes de *Agrobacterium*. La colección puede ser mantenida en forma de F cultivos de *Agrobacterium*, cada uno albergando uno de los F clones, mantenidos de forma separada y almacenados en condiciones de congelación. En este caso F ha de ser mayor o igual que N. Esta opción es la habitual para un N número pequeño y conocido, como 5, 10, 20 o 100 secuencias distintas, en cuyo caso F es habitualmente igual a N. También es el caso habitual para un número N pequeño pero desconocido, como 5, 10, 20 o 100 secuencias distintas, en cuyo caso F es habitualmente mayor que N. Alternativamente, cuando N es un número grande, generalmente mayor que 10 y habitualmente mayor que 50 e incluso mayor que 1000, la colección "semilla" puede conservarse en forma un stock conjunto mantenido en condiciones de congelación o liofilización que contiene un número F de bacterias viables, donde F es mucho mayor, al menos un orden de magnitud mayor que N.

Para obtener una mezcla policlonal recombinante, el cultivo semilla de *Agrobacterium* se cultiva el tiempo suficiente para al menos duplicar y habitualmente multiplicar por 5 o incluso por 10 o más el número inicial de células contenidas en la alícuota inicial. A continuación este cultivo se transfiere a una solución tampón adecuada, se diluye convenientemente obteniéndose la mezcla de infiltración, que posteriormente se inocula en algún punto discreto de la planta huésped mediante alguna de las tecnologías de agroinoculación disponibles en el estado del arte.

En una realización particular, los clones virales están desprovistos de la capacidad de movimiento sistémico. En este caso se hace llegar artificialmente la mezcla de infiltración al mayor número posible de células huésped. Para ello se ponen en contacto las células de *Agrobacterium* presentes en la mezcla de infiltración con las células de la planta huésped de forma que las primeras sean competentes para transferir su T-DNA a las segundas de forma eficiente. Esto se puede llevar a cabo mediante agroinfiltración, mediante inmersión a vacío o mediante cualquier otro sistema asequible al estado del arte, como técnicas de spray, uso de abrasivos, surfactantes, etc.

Una vez el T-DNA alcanza el núcleo de algunas células, el replicón se transcribe, dando lugar a un genoma viral activo que se replica en la célula inicial y se transfiere a las células vecinas. A continuación la planta infectada por la mezcla policlonal de replicones

se mantiene en condiciones favorables de luz y humedad por un periodo variable de tiempo que comprende entre 4 días como mínimo y el ciclo completo de crecimiento de la planta como máximo; durante este tiempo los clones virales se replican, se mueven célula a célula hasta encontrar una célula ocupada por otro replicón, y traducen la proteína de interés cuya información albergan en su genoma. En conjunto, el resultado final es una distribución en mosaico de los diferentes clones a lo largo y ancho de la superficie de la planta. En dicho mosaico, cada tesela está formada por un número variable de células. Las células interiores de la tesela expresan exclusivamente una de las proteínas recombinantes de la mezcla, o cuando menos la expresan en una proporción molar muy mayoritaria, donde el rango de contaminación con otras proteínas de la mezcla es menor al límite de detección de proteínas fluorescentes en un microscopio confocal y en cualquier caso menor del 10% en relación molar. Excepcionalmente algunas células situadas en la frontera entre dos teselas contiguas pueden expresar más de una proteína recombinante en proporciones molares cercanas a 50%. El número total de éstas células frontera susceptibles de expresar simultáneamente más de una proteína recombinante está en función del tamaño medio de la teselas. El tamaño medio de las teselas depende a su vez de la concentración de células de *Agrobacterium* en la mezcla de infiltración, y por extensión de la densidad óptica total del cultivo (ODT), siendo este parámetro modulable experimentalmente. En conjunto, el número máximo de células susceptibles de co-expresar de forma detectable más de una proteína fluorescente puede ser ajustado experimentalmente de forma que sea menor del 10%, o menor del 5% y eventualmente menor del 1%.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cosecha el material vegetal y se purifica el conjunto de proteínas interés utilizando un método de purificación que sea común a todos los componentes de la mezcla, obteniéndose una mezcla policlonal de proteínas de composición definida.

La presente invención permite modular el tamaño y número de teselas del mosaico de expresión mediante la manipulación de la densidad óptica de la mezcla de infiltración. Así, mezclas de infiltración de N clones con ODT de 0.1 dan lugar a teselas de mayor tamaño que mezclas de infiltración conteniendo los mismos N clones a una ODT de 0.033. A su vez mezclas de infiltración de N clones con ODT de 0.033 dan lugar a teselas de mayor tamaño que mezclas de infiltración conteniendo los mismos N clones a una ODT de 0.01. Las teselas grandes conteniendo de media varias decenas o incluso

centenares de células necesitan de menores concentraciones de *Agrobacterium*, lo que facilita la eliminación de posible toxinas asociadas a esta bacteria. Además el empleo de teselas grandes minimiza la interacción residual entre clones, ya que ésta tiene lugar fundamentalmente en la zona frontera entre teselas contiguas. Por su parte, la utilización de teselas pequeñas, comprendiendo unas pocas células o decenas de células de media, facilita la expresión de un mayor número de clones por planta, favoreciendo la diversidad policlonal. Asimismo, la utilización de teselas pequeñas formadas por unas pocas células o decenas de células minimiza la influencia de la velocidad de movimiento (Vi) en la composición final de la mezcla.

En la presente invención se hace referencia a una colección "semilla", la cual comprende un número N de clones distintos y conocidos, conservados de forma separada en forma de N cultivos criopreservados. Así mismo, la presente invención permite modular la composición final de la mezcla policlonal mediante la manipulación de la composición de la mezcla de infiltración. Dado un tiempo de incubación suficientemente largo para que se hayan colonizado todas las células de la planta, la abundancia relativa de cada proteína en la mezcla (Ci) estará en función de los siguientes parámetros: (Vi) la velocidad de movimiento célula a célula de cada clon; (Pi) los niveles de producción de proteína específicos de cada clon; (ODRi) la abundancia relativa de cada clon en el inóculo inicial. Siendo Pi y Vi valores constantes y específicos para cada clon, es posible manipular la composición de la mezcla modificando los valores de ODRi para cada clon. Para ello, los N clones semilla son crecidos de forma separada el tiempo suficiente para al menos duplicar y habitualmente multiplicar por 5 o incluso por 10 o más el número inicial de células contenidas en la alícuota inicial. A continuación se determina la densidad óptica de cada cultivo y se procede a mezclar los distintos cultivos en proporciones definidas para dar lugar a la mezcla de infiltración final. La manipulación de las ODs relativas de cada clon permite modular de forma significativa y reproducible la composición final de la mezcla, ya que este parámetro determina la abundancia relativa de los foci iniciales que infectan a la planta para cada clon.

En una realización particular de la técnica, la expresión policlonal basada en vectores virales con interferencia homóloga se combina con otro sistema de expresión que no presenta el fenómeno de interferencia homóloga. En una realización particular, el segundo sistema "no interferente" consiste en la transferencia mediada por *Agrobacterium* de un T-DNA que no comprende ninguna estructura autoreplicativa. Esta

realización particular permite producir complejos multiprotéicos recombinantes en la que uno o varios de los componentes de la mezcla son variables y se expresan mediante el uso de una plataforma con interferencia homóloga, y el resto de los componentes son constantes para todos los clones y se co-expresan mediante un sistema sin interferencia homóloga. En otra realización particular del procedimiento mixto, la parte variable del complejo multiproteico está constituido por una mezcla policlonal de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, mientras que la parte constante está formada por un péptido constante que media la formación de estructuras poliméricas de anticuerpos como la cadena J, o por una estructura que protege a los anticuerpos frente a degradación proteolítica como el Componente Secretor.

En la presente invención, el término "repertorio complejo de N moléculas recombinantes" se refiere a N moléculas de DNA o RNA recombinantes, N proteínas recombinantes codificadas por dichas moléculas de DNA o RNA, o los metabolitos resultantes de la actividad de dichas N proteínas recombinantes. Preferentemente, este término se refiere a un conjunto de más de 10 moléculas de DNA o RNA que difieren entre sí al menos en un nucleótido de su secuencia nucleotídica o un conjunto de más de 10 proteínas distintas que difieren entre sí al menos en un amino-acido de su secuencia peptídica y que son producidas en un organismo distinto del que son originales mediante estrategias de DNA recombinante.

En la presente invención, el término "N proteínas recombinantes" se refiere a N enzimas, N inmunoglobulinas, N receptores de membrana, N receptores intracelulares, N lectinas N anticuerpos policlonales, N antivenenos basados en antisueros, N sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, y N inmunoglobulinas intravenosas.

En la presente invención, el término "colección de N secuencias nucleotídicas distintas" se refiere a un conjunto formado por un número indeterminado de fragmentos de DNA o RNA que difieren entre sí al menos en una posición nucleotídica dentro de su secuencia.

En la presente invención, el término "vector viral de destino" se refiere a un ácido nucleico derivado de un virus que codifica la funciones necesarias para su reproducción en la célula huésped y en el cual se integran de forma recombinante aquellos fragmentos de ácidos nucleicos que se pretende expresar de forma recombinante.

En la presente invención, el término “colección de clones virales” se refiere a un conjunto de ácidos nucleicos derivados de un virus que difieren en su secuencia en al menos en un nucleótido.

En la presente invención, el término “planta huésped” se refiere a cualquier organismo vegetal en cuyas células puede tener lugar la replicación de un virus o un vector viral.

En la presente invención, el término “planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático o un fragmento de la misma” se refiere a una planta completa o un fragmento de una planta que comprende un conjunto de más de dos células, en las cuales se ha introducido mediante técnicas de transformación genética un conjunto de transgenes de manera tal que cada célula individual recibe y expresa cero, uno o más de un transgen, los cuales transgenes no son necesariamente idénticos a los que recibe y expresa el resto de las células del conjunto, y en las que el paquete de cero uno o más genes recibidos puede o no integrarse establemente en el genoma y por tanto puede o no transmitirse a la progenie y dejar de expresarse en dichas células al cabo de un cierto tiempo.

En la presente invención, el término “clon infectivo insertado en un vector binario” se refiere a una secuencia de DNA derivada de un virus vegetal que se encuentra insertada en un vector binario y que, transferido el conjunto al núcleo de una célula, es capaz de inducir su propia transcripción dando lugar a una molécula de RNA con capacidad para infectar la célula huésped.

En la presente invención, el término “transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens*” se refiere a una transferencia de una o más moléculas de DNA desde el citoplasma de la bacteria *Agrobaterium* al núcleo de la célula vegetal, que tiene lugar de forma transitoria sin que ocurra necesariamente la integración estable de dichas moléculas de DNA o parte de las mismas en el DNA cromosómico de la célula huésped.

En la presente invención, el término “función de movimiento sistémico” se refiere a la capacidad de un virus vegetal de moverse largas distancias dentro de la planta huésped viajando a través de su sistema vascular.

En la presente invención, el término “sistema mecánico” se refiere a cualquier

procedimiento que implique la aplicación de una fuerza, una presión externa o una corriente eléctrica o cualquier otro mecanismo de permeabilización de membrana para favorecer la entrada de un DNA en la célula huésped.

En la presente invención, el término "variante de secuencia de una familia de proteínas" se refiere a cada una de las variantes individuales que se pueden presentar en un conjunto de proteínas de una misma familia.

En la presente invención, el término "sistema de expresión sin interferencia homóloga" se refiere a cualquier sistema de producción de proteínas recombinantes que esté basado en un vector que de forma natural no presenta el fenómeno de interferencia homóloga, es decir, que en el caso de que dos o más clones de dicho vector colonicen la misma célula, éstos no se excluyen necesariamente entre sí de modo que ninguno de ellos prevalece necesariamente sobre los demás.

En la presente invención, el término "secuencias variables de inmunoglobulinas" se refiere a las regiones de proteínas inmunoglobulinas que presentan alta variabilidad de secuencia y donde reside su capacidad de unión al antígeno.

En la presente invención, el término "secuencias variables de inmunoglobulinas o sus fragmentos seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes como phage display" se refiere a todo o parte de una o varias regiones variables de inmunoglobulinas seleccionadas por su capacidad de unión a un determinado antígeno o conjunto de antígenos mediante procedimientos de selección *in vitro.*

En la presente invención, el término "repertorio complejo de anticuerpos policlonales" se refiere a un conjunto formado por un número mayor de diez proteínas inmunoglobulinas distintas, donde la diferencia entre ellas radica, al menos parcialmente, en la secuencia aminoacídica de sus regiones variables.

En la presente invención, el término "extracto crudo" se refiere a una mezcla compleja de compuestos, obtenida a partir de una planta o tejido vegetal y que se obtiene mediante un proceso de extracción que incluye la ruptura de las células del tejido vegetal a partir del que se obtiene y la solubilización de los compuestos celulares liberados en un solvente

adecuado.

En la presente invención, el término “mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto crudo” se refiere a un conjunto de N anticuerpos distintos, que difieren entre sí al menos en un aminoácido de su secuencia peptídica, aislados a partir de un extracto crudo del material vegetal donde se producen de forma recombinante en condiciones que permiten la eliminación total o parcial del resto de los compuestos celulares presentes en el extracto.

En la presente invención, el término “repertorio complejo de antivenenos basados en antisueros” se refiere a un conjunto de inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros de animales inmunizados con una sustancia tóxica.

En la presente invención, el término “repertorio complejo de sueros inmunológicos para inmunidad pasiva” se refiere a un conjunto de inmunoglobulinas obtenidas a partir de sueros de animales inmunizados frente a un agente patógeno o una sustancia tóxica y que resultan efectivos en la protección de un organismo receptor frente a dicho agente patógeno o dicha sustancia, sin necesidad de activar una respuesta inmunológica en el organismo receptor.

En la presente invención, el término “repertorio complejo de inmunoglobulinas intravenosas” se refiere a un conjunto formado por un número indeterminado de inmunoglobulinas distintas que se pueden suministrar a un animal o a un ser humano por vía intravenosa para producirle algún tipo de beneficio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Producción individualizada de VHHs. (A) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las 9 VHHs producidas en plantas de N. *benthamiana:* SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 6, SEQ. ID. No. 7, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. y SEQ. ID. No. 9. (B) Análisis Western Blot de las diferentes VHHs producidas de forma individualizada.

Figura 2. Producción de un repertorio oligoclonal de VHHs en una planta transitoriamente oligo-transgénica. (A) Análisis SDS-PAGE de fracciones purificadas (E1 y E2) y último lavado (F) de un repertorio de 9 VHHs producidas en una planta transitoriamente oligo-transgénica de la invención. El bandeo discreto de proteínas está revelado con azul de Coomassie. (B) Electroforesis en 2D con revelado de nitrato de plata de la fracción E2.

Figura 3. Producción de un repertorio policlonal de VHHs en una planta transitoriamente multi-transgénica. (A) Análisis SDS-PAGE de fracciones purificadas (E1 y E2) y él último lavado (F) de un repertorio formado por un número indefinido de VHHs ($F>10^4$) producidas en una planta transitoriamente multi-transgénica de la invención. El bandeo continuo de proteínas está revelado con azul de Coomassie. (B) Electroforesis 2D con revelado mediante marcaje fluorescente diferencial (DIGE) de tres fracciones E2 correspondientes a tres experimentos independientes de producción de VHHs policlonales. Los tres experimentos se realizaron a partir de un mismo cultivo semilla de *Agrobacterium tumefaciens* que alberga una genoteca de VHHs obtenidas de sueros de camellos no hiper-inmunizados.

Figura 4. Gráficos de dispersión de las fracciones purificadas de VHH policlonales producidas en tres experimentos independientes. El eje de abcisas representa el ratio de intensidad entre dos experimentos para cada spot. El eje de ordenadas representa la intensidad absoluta (volumen) de cada spot en el experimento DIGE.

Figura 5. Gráficos de frecuencias relativas de las 100 variantes de secuencia más abundantes obtenidas mediante secuenciación masiva Ion Torrent. Los porcentajes representan la frecuencia relativa de cada unigen individual frente al total de unigenes de su muestra. (A) Distribución de frecuencias muestra EXP1 (B) Distribución de frecuencias muestra EXP2.

Figura 6. Actividad anti-veneno *in vitro* medida mediante ensayos ELISA de los distintos

repertorios VHH obtenidos de plantas multitransgénicas transformadas con librerías provenientes de muestras preinmunes (C1P, C2P y C3P) e hiperinmunes (C1H, C2H y C3H) de camellos. (A) Actividad de los distintas muestras ensayadas frente al veneno de *Crotalus simus* y frente a BSA (B) Comparación de la actividad de las muestras hiperinmunes frente al veneno de *Crotalus escutulatus* y frente a venenos no relacionados de cobra (*N. ninubiae* y *N. mossambica*). Eje de abscisas representa la absorbancia a 492 nm, y en el eje de ordenadas (A) diluciones de extractos de VHH, (B) diluciones seriadas VHH (microgramos).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficacia de la invención en producir plantas multi-transgénicas así como la reproducibilidad del método para la producción de repertorios complejos de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes, objeto de la presente invención. En concreto, los ensayos realizados muestran la producción de repertorios complejos de N proteínas recombinantes. La existencia de N proteínas recombinantes necesariamente implica la presencia de N moléculas de DNA y RNA recombinantes precursores de las mismas. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Producción de una mezcla oligoclonal de nano-anticuerpos de camello (VHHs) en plantas de *N. benthamiana* transitoriamente oligo-transgénicas

Para demostrar las posibilidades de la expresión policlonal basada en interferencia homóloga para la producción de mezclas de moléculas recombinantes, preferentemente proteínas recombinantes de interés industrial o farmacéutico, se utilizó de manera preferente y no limitante una pequeña colección de clones de fragmentos de anticuerpos camélidos de simple cadena (también llamados nanobodies o VHHs).

En este ejemplo se comprobó la posibilidad de producir simultáneamente un número discreto (N<10) de proteínas recombinantes dando lugar a una mezcla de composición

definida (oligoclonal) donde se conoce la identidad de todas y cada una de las proteínas de la mezcla. Para ello una población de VHHs fue amplificada a partir de una preparación de cDNA obtenida de una fracción de células nucleadas de sangre de camello utilizando los oligonucleótidos VHHF (SEQ. ID. No. 10) y VHHR (SEQ. ID. No. 11). A partir de la dicha amplificación, las VHHs fueron transferidas el vector pGTMV (SEQ. ID. No. 12) utilizando una reacción GoldenGate de un solo fragmento (Engler et al., 2009; Engler et al., 2008; Sarrion-Perdigones et al., 2011) mediada por ligasa de T4 y el enzima de restricción BsaI en una incubación de 35 ciclos. De esta forma se aislaron los nueve clones distintos (pGTMV_VHH1 hasta pGTMV_VHH9) que se utilizaron en la expresión oligoclonal. Todas las construcciones contenían una fusión a una cola de seis histidinas incorporadas por el vector pGTMV. Las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes de cada una de las 9 VHHs clonadas se muestran como SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3, SEQ. ID. No. 4, SEQ. ID. No. 5, SEQ. ID. No. 6, SEQ. ID. No. 7, SEQ. ID. No. 8, SEQ. ID. No. y SEQ. ID. No. 9. Un alineamiento amino-acídico de las secuencias VHH implicadas en el experimento se muestra en la FIGURA 1A.

En primer lugar se ensayó la expresión individualizada de las diferentes VHH. Todos los clones derivados de pGTMV fueron transferidos a *Agrobacterium tumefaciens* y conservados en forma de cultivos semilla. Posteriormente, una alícuota de 10 μL de cada uno de los cultivos semilla se descongeló y se creció a 28ºC en agitación (200 rpm) durante 18h en 1 mL de LB con 12μg/mL de Carbencilina y 50 μg/mL de Rifampicina. A continuación, 100 μL de cada cultivo se transfirieron a 5 mL de LB con 12μg/mL de Carbencilina y 50 μg/mL de Rifampicina y se crecieron durante 18h a 28ºC en agitación (200 rpm). Los cultivos resultantes de centrifugaron a 500 g durante 15 minutos y el precipitado de células se resuspendió en 10 mL de tampón de infiltración (MES 10mM pH 5,6, Cloruro cálcico 10mM, acetosiringona 2μM).

De igual forma se procedió con cultivos de *Agrobacterium* que albergan el módulo 5´de TMV deconstruído (pICH17388) y el módulo integrasa (PICH14011) necesarios para el establecimiento del replicón viral (Marillonnet et al., 2004a). Se midió la densidad óptica (OD) de cada cultivo de *Agrobacterium* y se realizaron las diluciones pertinentes en tampón de infiltración para llevar cada cultivo a una OD=0.1 medida en un espectrómetro. Posteriormente se realizaron nueve mezclas, una para cada VHH (pGTMV_VHHi: pICH17388: PICH14011 en proporción 1:1:1), y cada mezcla se infiltró por separado en

los espacios intercelulares de hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante una jeringa de 2 mL sin aguja. Se infiltraron 3 hojas por muestra, utilizando para ello plantas diferentes. Durante los días siguientes a la infiltración se observó en algunos clones la aparición de un fenómeno de necrosis similar a la respuesta hipersensible (HR) por lo que se decidió adelantar el proceso de recolección con anterioridad a la aparición de síntomas (6 dpi) y recolectar todas las plantas en esa fase. Tras la recolección las muestras (hojas enteras) se pesaron y congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a -80ºC. Para la extracción el material vegetal se trituró el material vegetal en un mortero en presencia de nitrógeno líquido con tampón PBS en proporción 1:3 (peso de tejido: volumen de tampón). Posteriormente el extracto crudo se centrifugó a 10 krpm durante 15 min a 4ºC y el sobrenadante se filtró dos veces con papel de filtro y una vez más en filtros steriCup. El extracto resultante se pasó por una columna de afinidad Ni Agarose y la proteínas purificadas se eluyeron en tampón fosfato 50 mM a pH4.0 y la fracción de elución se neutralizó inmediatamente con 1/5 de volumen de PBS. Una alícuota de 6 µl de cada elución se resolvió en una electroforesis PAGE y se reveló por Western blot utilizando un anticuerpo primario murino anti-histidinas seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a la peroxidasa de rábano. El resultado de dicho Western blot se puede observar en la FIGURA 1B. Todas las VHHs ensayadas se expresaron y purificaron en *N. benthamiana*, aunque con distintos rendimientos. Así, las VHH4, VHH5, VHH6, VHH7, VHH8 y VHH9 se produjeron a niveles entre 80 y 120 µg de proteína purificada por gramo de peso fresco, mientras que para las tres VHHs restantes se obtuvieron niveles de entre 2 y 10 µg de proteína por gramo de peso fresco.

Seguidamente se ensayó la expresión oligoclonal de las nueve VHHs. Para ello los cultivos semilla se crecieron individualmente tal y como se describió en el experimento anterior, pero en este caso todos los cultivos se combinaron en usa sola mezcla de infiltración formada por los cultivos (pGTMV_VHH1: pGTMV_VHH2: pGTMV_VHH3: … :pGTMV_VHH9 .pICH17388: PICH14011) en proporción (1:1:1: …:1:9:9). Se realizó una única infiltración en tres hojas de tres plantas distintas de *N. benthamiana.* Transcurridos 6 dpi, el material vegetal se recolectó y las proteínas recombinantes se purificaron siguiendo el procedimiento descrito más arriba. Como resultado se obtuvo una mezcla de VHHs con un rendimiento de 80 µg de proteína purificada por gramo de peso fresco. La mezcla se resolvió mediante electroforesis PAGE como se muestra en la FIGURA 2A. En esta figura se muestran las carreras correspondientes al último lavado (F) y dos eluciones sucesivas (E1 y E2) del proceso de purificación. En dicha electroforesis, revelada con

azul de Coomassie, se observa un patrón discreto de bandas compatible con la expresión simultánea de varias VHHs. Dado que las distintas VHHs tienen tamaños similares, a continuación se procedió a resolverlas atendiendo a las diferencias de punto isoeléctrico mediante una electroforesis en dos dimensiones. Así, 25 μg de la mezcla policlonal recombinante previamente purificada por afinidad se resolvieron en geles de 2D con un rango de pH entre 4.0 y 9.0, y posteriormente se detectaron mediante tinción con plata. En la FIGURA 2B se muestra el resultado de la electroforesis 2D, en la que es posible identificar un mínimo de 9 spots diferenciables en la banda de pesos moleculares correspondientes a las proteínas del tipo VHH, lo que demuestra la composición oligoclonal de la muestra.

EJEMPLO 2. Producción de una mezcla policlonal de anticuerpos VHH

En este ejemplo se demuestra la posibilidad de producir repertorios complejos o muy complejos (N>100) de proteínas recombinantes de composición desconocida de forma reproducible. Para ello se realizó una reacción Goldengate con las VHHs amplificadas con los oligos SEQ. ID. No. 1, y SEQ. ID. No. 2 a partir de cDNA obtenido de una fracción de células nucleadas de sangre de camello y dicha mezcla de reacción se transformó directamente en células competentes de *Agrobacterium* GV2011 sembrándose posteriormente en placas LBAgar suplementadas con 50 μg/mL de kanamicina. Los $2x10^4$ clones resultantes se recogieron directamente de las placas en alícuotas de 0.5 mL de medio LB y se congelaron a -80ºC en presencia de 15% glicerol. Posteriormente se descongeló una de las alíquotas y se subcultivó en 5 mL de LB durante 2 horas. El cultivo resultante (cultivo pGTMV_VHHp) se centrifugó a 500 g durante 15 minutos y el precipitado de células se resuspendió en 10 mL de tampón de infiltración (MES 10mM pH 5,6, Cloruro cálcico 10mM, acetosiringona 2μM). De igual forma se procedió con cultivos de *Agrobacterium* que albergan el módulo 5´de TMV deconstruído (pICH17388) y el módulo integrasa (PICH14011) necesarios para el establecimiento del replicón viral (Marillonnet et al., 2004b). Se midió la OD de cada cultivo de *Agrobacterium* y se realizaron las diluciones pertinentes en tampón de infiltración para llevar cada cultivo a una OD=0.1 medida en un espectrómetro. Posteriormente se combinaron los cultivos en la proporción adecuada (1:1:1) (pGTMV_ VHHp : pICH17388: PICH14011) y se procedió a infiltrar las mezclas en hojas de *N. benthamiana.* Para comprobar la reproducibilidad de la expresión policlonal, el mismo experimento se repitió en otras dos ocasiones con un grupo distinto de plantas partiendo de dos nuevas alícuotas criopreservadas del

pGTMV_VHHp. En total se realizaron tres experimentos independientes (EXP1, EXP2 y EXP3). En todos los casos se dejaron transcurrir seis días desde la infiltración y la recolección. Transcurridos los 6 dpi en cada caso, el material vegetal se recolectó separadamente y las proteínas recombinantes se purificaron siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior. Un análisis PAGE de las VHHs purificadas no reveló diferencias en el patrón de tamaños de la mezcla (FIGURA 3A). En esta figura se muestran las carreras correspondientes al último lavado (F) y dos eluciones sucesivas (E1 y E2) del proceso de purificación de uno de los experimentos. En dicha electroforesis, revelada con azul de Coomassie, se observa un patrón continuo de bandas compatible con la expresión simultánea de múltiples VHHs.

Posteriormente las tres mezclas policlonales de VHHs se resolvieron de forma conjunta atendiendo a las diferencias de punto isoeléctrico mediante una electroforesis en dos dimensiones. Así, 10 μg de cada mezcla policlonal recombinante previamente purificada por afinidad se etiquetaron cada una con un fluoróforo diferente y se sometieron a un análisis DIGE resolviéndose en un gel de 2D con un rango de pH entre 4.0 y 9.0. El escaneado posterior muestra la huella 2D de cada una de las mezclas recombinantes marcada con un fluoróforo diferente. El patrón de distribución de los spots resultó muy similar en los tres experimentos (FIGURA 3B), lo que demuestra la reproducibilidad de la técnica. Los geles de 2D se analizaron con el paquete de software Decyder. Se detectaron un número mínimo de 216 spots mayoritarios. Todos spots mayoritarios resultaron ser coincidentes en los tres experimentos. A partir de los datos de volumen de cada spot se realizó un análisis de dispersión de los datos entre los diferentes experimentos tomados de dos en dos. En la FIGURA 4A se muestra gráficamente la estrecha distribución de la dispersión entre experimentos, lo que indica una alta reproducibilidad entre experimentos independientes. La gráfica de dispersión mostrada en la FIGURA 4 representa para cada punto el logaritmo del ratio entre las intensidades relativas de dicho punto en los dos experimentos en comparación. La altura en el eje de ordenadas representa la intensidad (volumen) de cada spot analizado. Se observa que sólo algunos spots de muy baja intensidad presentan diferencias significativas, posiblemente debidos a diferencias de sensibilidad, mientras que la mayoría de los spots están centrados en un margen muy estrecho en torno al valor cero de logaritmo de los ratios de expresión.

Se han realizado ensayos de secuenciación masiva que muestran la producción de repertorios complejos de N moléculas recombinantes. Para ello, se tomaron muestras de hojas correspondientes a los experimentos EXP1 y EXP2 citados anteriormente (1,5 gramos de material vegetal por cada experimento) y se procedió a la extracción de RNA total de estos tejidos. Tras un tratamiento con DNAsa se procedió a la síntesis de DNA copia utilizando un oligonucleótido específico que se muestra como SEQ. ID. No. 13. Las muestras resultantes se amplificaron por PCR en 25 ciclos utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Platinum PCR Super Mix Hihg Fidelity, Life technologies). Para ello se utilizó como cebador directo un oligonucleótido cuya secuencia se muestra como SEQ. ID. No. 14, y como cebadores reversos sendos oligonucleótidos cuyas secuencias se muestra como SEQ. ID. No. 15 para la muestra EXP1 y SEQ. ID. No. 16 para la muestra EXP2 respectivamente. Cada oligonucleótico incorpora un código de barras que permite la identificación de la muestra a la que pertenece durante el proceso de secuenciación masiva. Los fragmentos amplificados corresponden a la región variable de los anticuerpos VHH. La secuenciación del dominio hipervariable CDR3, situado dentro de dicha región permite obtener una buena estimación de la diversidad del repertorio de secuencias VHH expresadas en la planta. Los amplicones resultantes fueron purificados y llevados a una concentración final de 50 ng/μL. Diez microlitros de cada muestra fueron utilizados en la secuenciación masiva mediante la tecnología Ion Torrent. En total, de la muestra EXP1 se obtuvieron 1105958 lecturas y de la muestra EXP2 se obtuvieron 148815 lecturas. Las secuencias resultantes fueron analizadas y ensambladas con el programa iAssembler para generar una colección de unigenes de 150 nucleótidos, que se corresponden aproximadamente con las distintas regiones CDR3 expresadas en la planta (http://bioinfo.bti.cornell.edu/tool/iAssembler/). El número de lecturas para cada unigen sirvió como estimación de la frecuencia de expresión de cada CDR3. La FIGURA 5 muestra la distribución de frecuencias para los CDRs más abundantes en ambos experimentos. Como se puede observar, a pesar de la extrema diversidad del repertorio de regiones CDR3 expresadas en la planta, la proporción relativa de cada CDR3 se mantuvo constante con ligerísimas variaciones en los dos experimentos independientes. Se puede concluir por tanto que el análisis del repertorio de transcritos correspondientes a las regiones CDR3 expresadas en las plantas multitransgénicas muestra una alta complejidad (más de 2000 variantes expresadas simultáneamente representadas por dos o más lecturas idénticas), pese a lo cual la composición de la mezcla resultante es altamente estable. Los resultados de experimentos respaldan así los datos obtenidos mediante electroforesis de proteínas en dos dimensiones.

Por último se ha ensayado la producción de repertorios complejos de anticuerpos recombinantes obtenidos a partir de animales hiper-inmunizados. Para ello se partió de tres muestras de sangre (C1H, C2H y C3H) obtenidas a partir de tres camellos hiperinmunizados frente a un cóctel de tres venenos de serpiente (*Crotalus simus*, *Crotalus scutulatum* y *Bothros asper*) usando un protocolo estándar de hiperinmunización. Se dispuso igualmente de muestras de sangre de los mismos ejemplares obtenidas previamente a la inmunización (muestras preinmunes C1P, C2P y C3P respectivamente). De todas y cada una de las muestras se generaron librerías en *Agrobacterium* siguiendo el procedimiento descrito anteriormente: se realizó una reacción Goldengate con las VHHs amplificadas con los oligos SEQ. ID. No. 1, y SEQ. ID. No. 2 a partir de cDNA obtenido de una fracción de células nucleadas de sangre de camello y dicha mezcla de reacción se transformó directamente en células competentes de *Agrobacterium* GV2011 sembrándose posteriormente en placas LBAgar. Los $2x10^4$ clones resultantes de cada librería se recogieron directamente de las placas en alícuotas de 0.5 mL de medio LB y se congelaron a -80ºC en presencia de 15% glicerol. Una alícuota de cada librería se combinó con los cultivos de *Agrobacterium* pICH17388 y pICH14011 en la proporción adecuada (1:1:1) y se agroinfiltró por separado en hojas de *Nicotiana benthamiana* siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se obtuvieron de este modo seis mosaicos somáticos diferentes (plantas multitransgénicas) denominadas C1H, C2H C3H, C1P, C2P y C3P respectivamente. Seis días tras la agroinfiltración, las muestras (hojas enteras) se trituraron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido con tampón PBS en proporción 1:3 (peso de tejido: volumen de tampón). Los extractos resultantes se centrifugaron a 10 krpm durante 15 min a 4ºC y los sobrenadantes se pasaron por columnas de afinidad Ni Agarose con el fin de purificar el repertorio de VHHs contenida en cada extracto. A continuación se determinó la actividad de unión de cada repertorio a distintos venenos de serpiente inmovilizados en placas ELISA. Para ello, los pocillos de las placas se tapizaron con venenos liofilizados y resuspendidos en tampón carbonato a una concentración de 2 μg/mL. Posteriormente los pocillos se incubaron con diluciones seriadas de los distintos repertorios VHH purificados y seguidamente se incubaron con un suero policlonal de conejo anti-VHHs. Finalmente se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa para revelar la unión. En todos los casos, los repertorios obtenidos a partir de plantas que expresaban librerías hiperinmunizadas (C1H, C2H y C3H) mostraban una alta capacidad de unión frente a los componentes de los venenos utilizados en la inmunización, mientras que la

actividad anti-veneno de las librerías preinmunes (C1P, C2P y C3P) no mostraban ninguna actividad. En la FIGURA 6A se muestra como ejemplo la actividad in vitro frente al veneno de *C.simus* (utilizado el cóctel de inmunización) de las tres muestras preinmunes (extractos crudos), comparado con la actividad de las muestras pre-inmunes equivalentes. En la FIGURA 6B se observa que la actividad anti-veneno es altamente específica, puesto que los repertorios C1H, C2H y C3H reaccionan fuertemente frente al veneno de *C. simus*, pero por el contrario no tienen ninguna actividad frente a albúmina bovina (BSA) o frente a venenos no relacionados como venenos de cobra (*Naja ninubiae y Naja mossambica*). Por tanto se puede concluir que mediante el método de la invención es posible producir plantas multitransgénicas capaces de reproducir, al menos parcialmente y de forma funcional, la respuesta inmune compleja de un camélido frente a un determinado antígeno. Las plantas multitransgénicas así obtenidas expresan en forma de mosaicos somáticos y de forma simultánea y reproducible, repertorios complejos o muy complejos de inmunoglobulinas frente a dicho antígeno.

BIBLIOGRAFÍA

Bregenholt S, Jensen A, Lantto J, Hyldig S and Haurum JS (2006) Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections. Curr Pharm Des 12:2007-2015.

Dunman PM and Nesin M (2003) Passive immunization as prophylaxis: when and where will this work? Curr Opin Pharmacol 3:486-496.

Elena SF, Bedhomme S, Carrasco P, Cuevas JM, de la Iglesia F, Lafforgue G, Lalic J, Prosper A, Tromas N and Zwart MP (2011) The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. Mol Plant Microbe Interact 24:287-293.

Engler C, Gruetzner R, Kandzia R and Marillonnet S (2009) Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. PloS one 4:e5553.

Engler C, Kandzia R and Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PloS one 3:e3647.

Folimonova SY (2012) Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. J Virol 86:5554-5561.

Gleba Y, Marillonnet S and Klimyuk V (2004) Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. Curr Opin Plant Biol 7:182 - 188.

Haurum JS (2006) Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? Drug Discov Today 11:655-660.

Klitgaard JL, Coljee VW, Andersen PS, Rasmussen LK, Nielsen LS, Haurum JS and Bregenholt S (2006) Reduced susceptibility of recombinant polyclonal antibodies to inhibitory anti-variable domain antibody responses. J Immunol 177:3782-3790.

Koefoed K, Steinaa L, Soderberg JN, Kjaer I, Jacobsen HJ, Meijer PJ, Haurum JS, Jensen A, Kragh M, Andersen PS and Pedersen MW (2011) Rational identification of an optimal antibody mixture for targeting the epidermal growth factor receptor. MAbs 3:584-595.

Kuroiwa Y, Kasinathan P, Choi YJ, Naeem R, Tomizuka K, Sullivan EJ, Knott JG, Duteau A, Goldsby RA, Osborne BA, Ishida I and Robl JM (2002) Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. Nat Biotechnol 20:889-894.

Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V and Gleba Y (2004a) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by Agrobacterium. Proc Natl Acad Sci U S A 101:6852-6857.

Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V and Gleba Y (2004b) In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by Agrobacterium (vol 18, pg 3852, 2004). Proc Natl Acad Sci U S A 101:15546-15546.

Orzaez D, Granell A and Blazquez MA (2009) Manufacturing antibodies in the plant cell. Biotechnology journal 4:1712-1724.

Pedersen MW, Jacobsen HJ, Koefoed K, Hey A, Pyke C, Haurum JS and Kragh M (2010) Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy. Cancer Res 70:588-597.

Sardanyes J and Elena SF (2011) Quasispecies spatial models for RNA viruses with different replication modes and infection strategies. PloS one 6:e24884.

Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juarez P, Fernandez-Del-Carmen A, Granell A and Orzaez D (2011) GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. PloS one 6:e21622.

Sharon J, Sarantopoulos S, Den W, Kao CY, Baecher-Allan CM, Santora KE, Sompuram SR, Petersen MS and Williams BR (2000) Recombinant polyclonal antibody libraries. Combinatorial-Chemistry-and-High-Throughput-Screening[print] June, 2000;@3:185-196.

Syller J (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. Mol Plant Pathol 13:204-216.

Wiberg FC, Rasmussen SK, Frandsen TP, Rasmussen LK, Tengbjerg K, Coljee VW, Sharon J, Yang CY, Bregenholt S, Nielsen LS, Haurum JS and Tolstrup AB (2006) Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells. Biotechnol Bioeng 94:396-405.

Ziebell H and Carr JP (2010) Chapter 6 - Cross-Protection: A Century of Mystery, in Adv Virus Res (John PC and Gad L eds) pp 211-264: Academic Press.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de al menos un repertorio complejo de N moléculas recombinantes, caracterizado por comprender los siguientes pasos:

i) ensamblar una colección de N secuencias nucleotídicas distintas en un vector viral de destino de forma tal que se genere una colección de N clones virales;

ii) transferencia de la colección de clones virales de forma conjunta y simultánea a una planta huésped,

iii) generación de una planta transitoriamente multi-transgénica estructurada en forma de mosaico somático donde más del 80% de las células expresan exclusivamente una de las N moléculas recombinantes, o bien la expresan muy mayoritariamente, en una proporción molar que supone al menos el 80% del total de N moléculas recombinantes producidas en esa misma célula.

2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes.

3. El método según las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que el vector viral de destino del paso ii) se encuentra en forma de un clon infectivo insertado en un vector binario y utiliza la transformación transitoria basada en *Agrobacterium tumefaciens* como mecanismo de entrada en las células de la planta huésped.

4. El método según la reivindicación 3, caracterizado por que el vector viral está desprovisto de su función de movimiento sistémico.

5. El método según la reivindicación 4, caracterizado por que el vector viral se hace llegar a las células de la planta huésped mediante un sistema mecánico.

6. El método según la reivindicación 5, caracterizado por que el sistema mecánico se selecciona de entre el siguiente grupo: infiltración a vacío, infiltración por sobrepresión y espray.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una variante de secuencia de una familia de proteínas.

8. El método según la reivindicación 6, caracterizado por que la familia de proteínas se selecciona de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, y lectinas.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, combinado con un sistema de expresión sin interferencia homóloga.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina.

11. El método según la reivindicación 10, caracterizado por que la inmunoglobulina es producida por linfocitos obtenidos a partir de animales inmunizados frente a un antígeno.

12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado por que las N secuencias nucleotídicas del paso i) codifican al menos una secuencia variable de al menos una inmunoglobulina o su fragmento, seleccionados mediante una técnica de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes.

13. Uso del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de homopolímeros.

14. Uso del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para producir de forma recombinante una mezcla compleja de heteropolímeros.

15. Una planta transitoriamente multi-transgénica o un fragmento de la misma, caracterizada por que es obtenida en el paso iii) del método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

16. La planta o el fragmento de la misma según la reivindicación 15, caracterizada por que expresa, al menos un repertorio complejo de anticuerpos policlonales.

17. La planta o el fragmento de la misma según la reivindicación 16, caracterizada por que los anticuerpos policlonales son similares a los producidos por un animal o un grupo de animales en respuesta a un proceso de inmunización frente a un antígeno, un grupo de antígenos o un agente patógeno.

18. Un extracto crudo obtenido de una planta descrita en cualquiera de las reivindicaciones 15-17.

19. Una mezcla purificada o parcialmente purificada de anticuerpos obtenidos a partir de un extracto descrito en la reivindicación 18.

20. Un repertorio complejo de N moléculas recombinantes caracterizado por que se produce mediante el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

21. El repertorio según la reivindicación 20, caracterizado por que las N moléculas recombinantes son N proteínas recombinantes.

22. El repertorio según la reivindicación 21, caracterizado por que las N proteínas recombinantes se seleccionan de entre el siguiente grupo: enzimas, inmunoglobulinas, receptores de membrana, receptores intracelulares, lectinas, anticuerpos policlonales, antivenenos basados en antisueros, sueros inmunológicos para inmunidad pasiva, e inmunoglobulinas intravenosas.

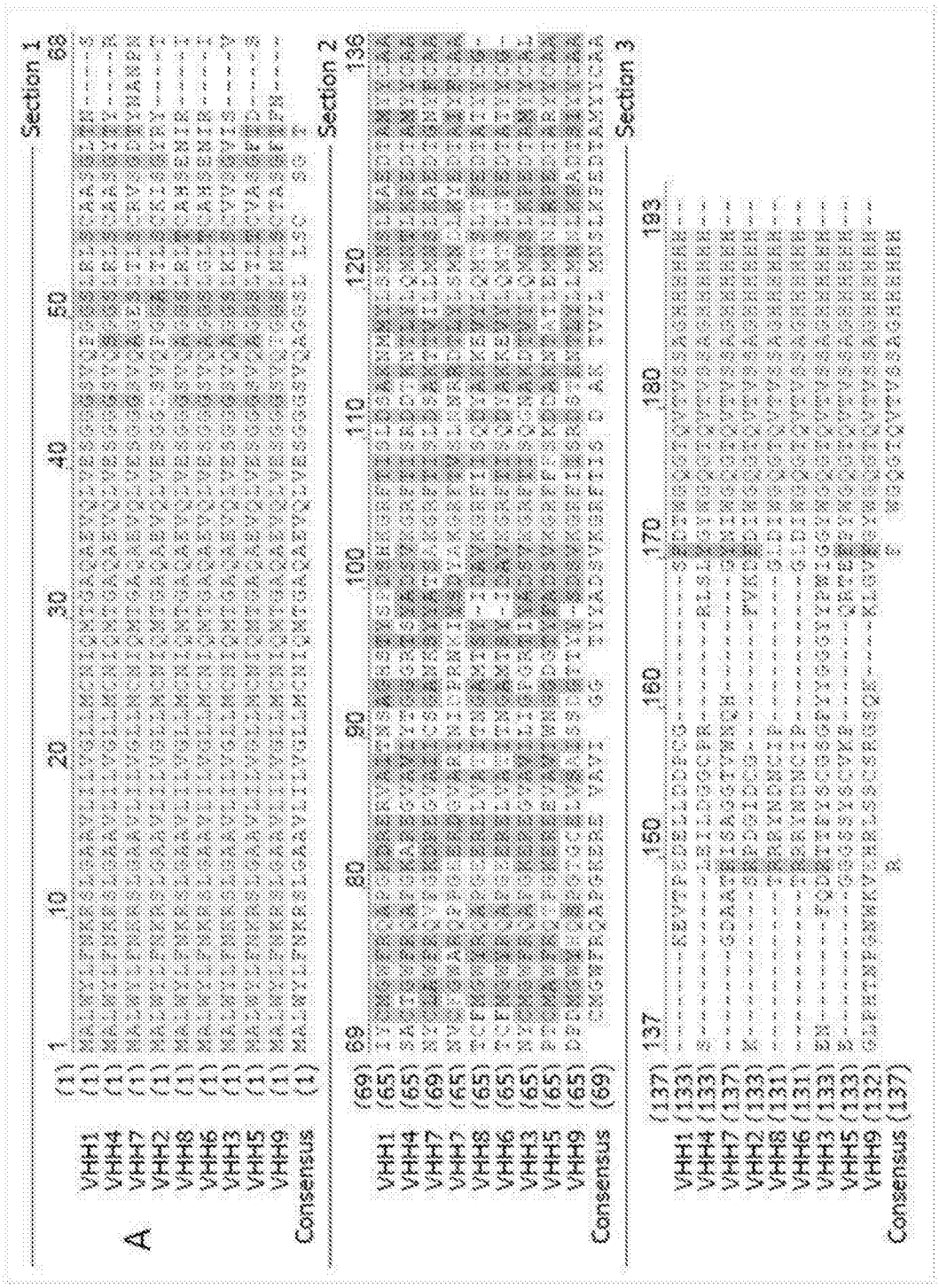


Fig. 1A

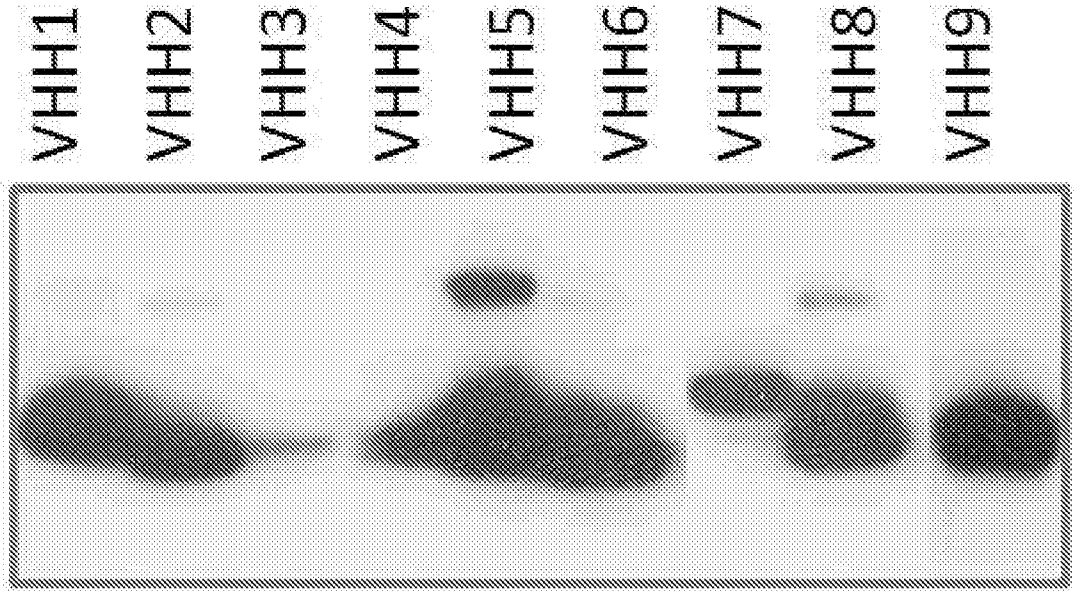


Fig. 1B

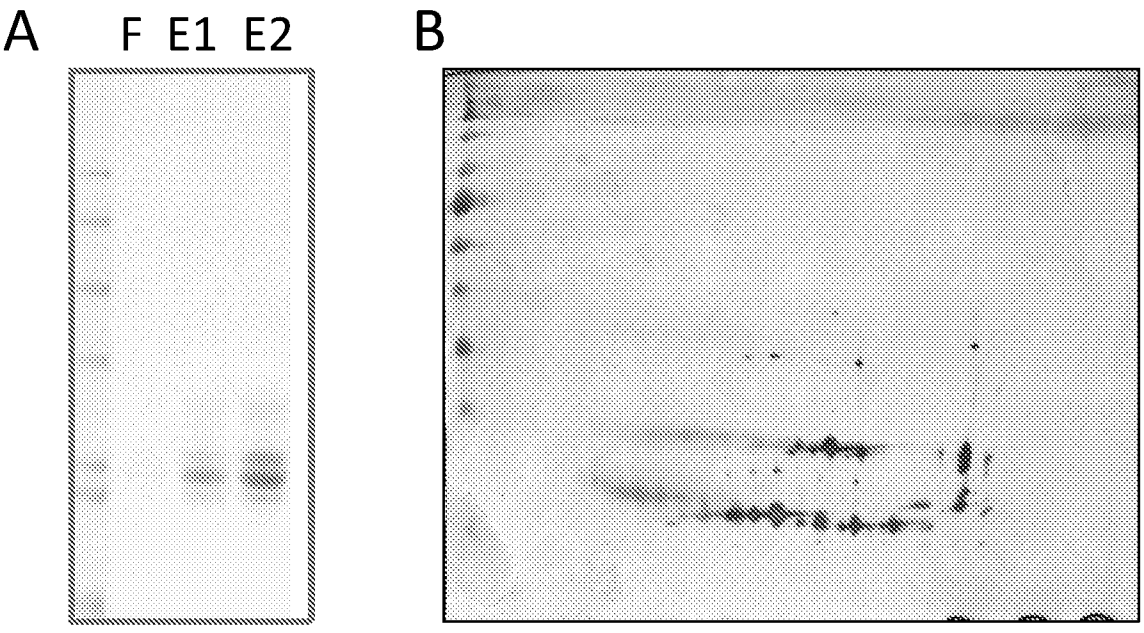


Fig. 2

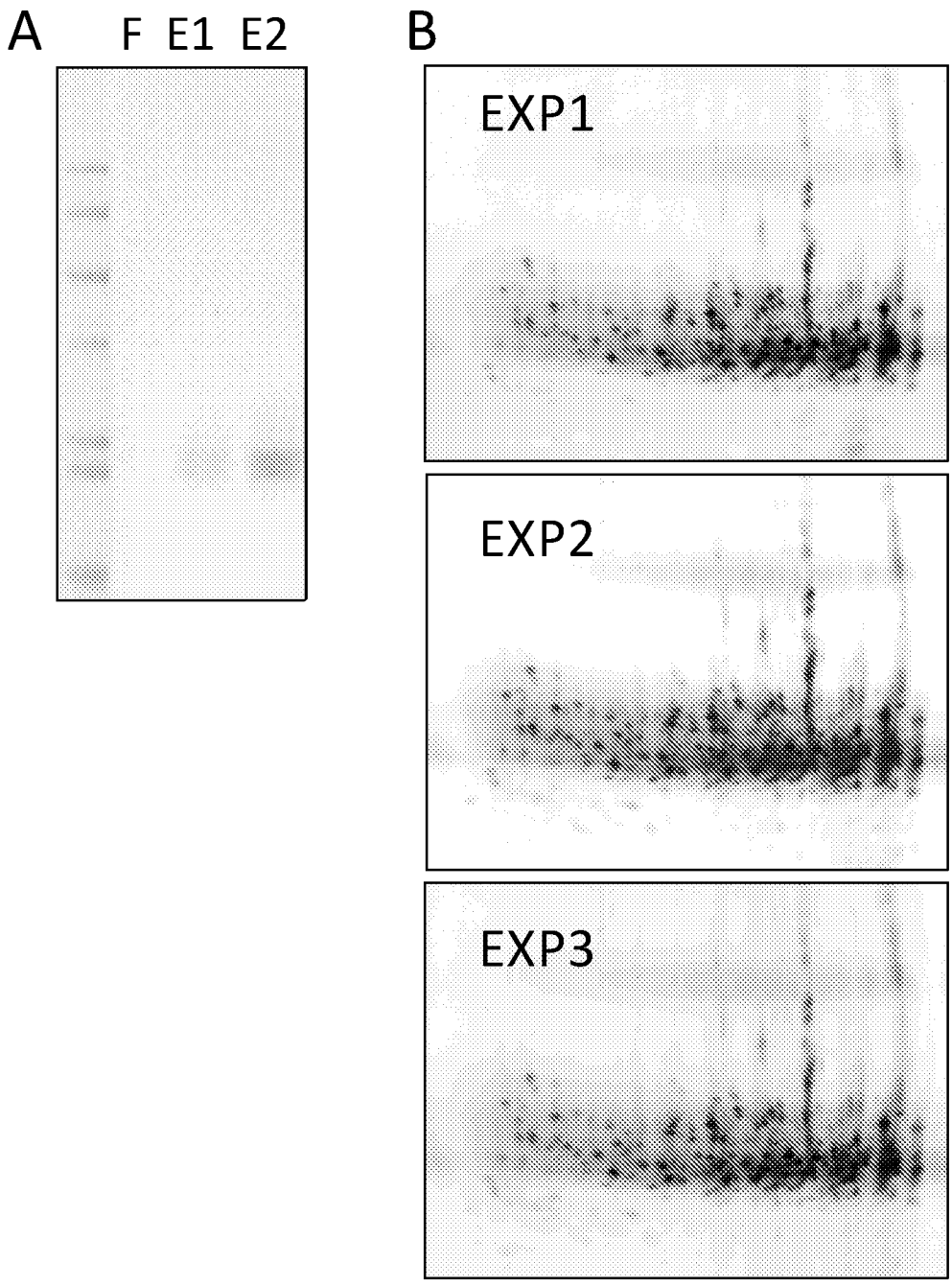


Fig. 3

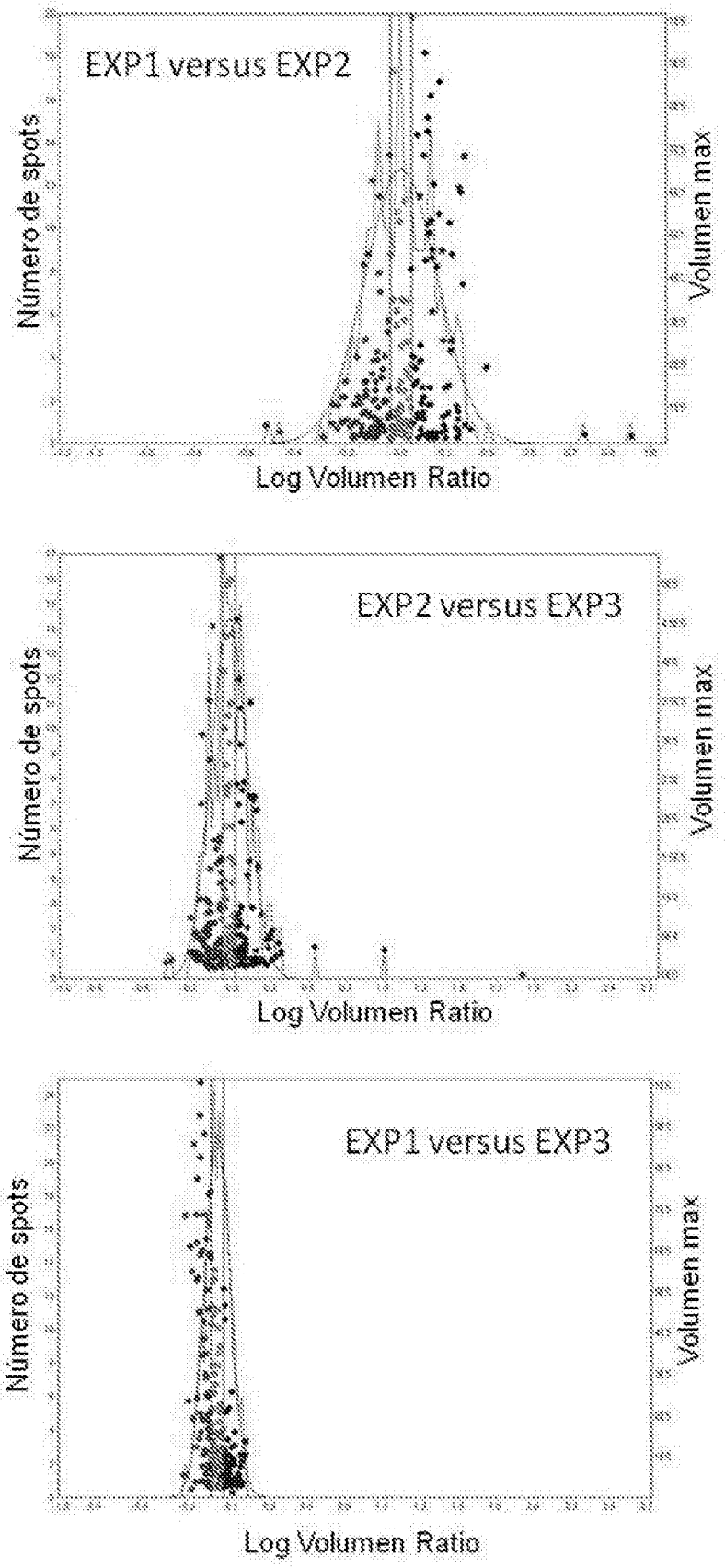
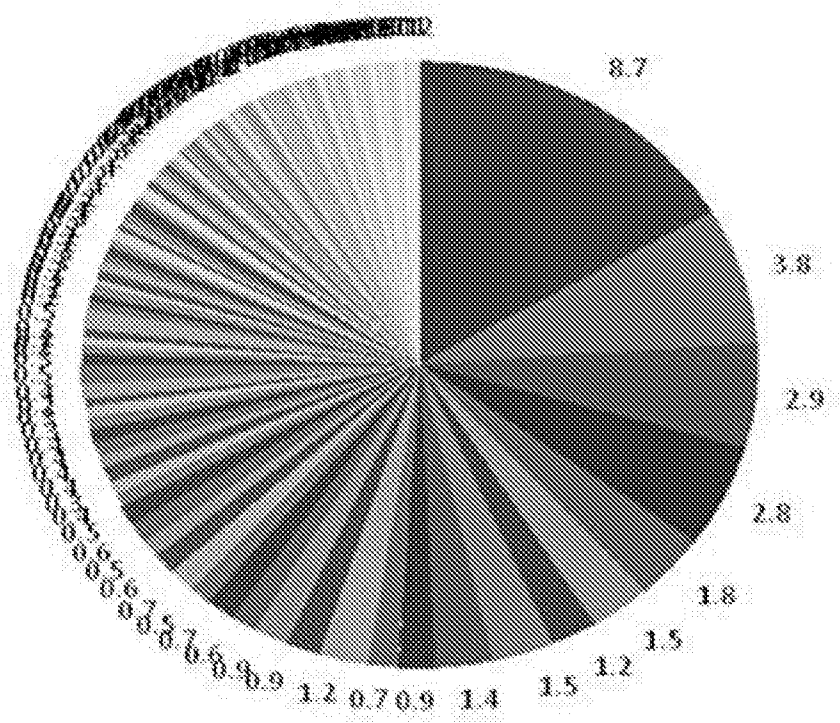

EXP1 versus EXP2
Número de spots
Volumen max
Log Volumen Ratio
EXP2 versus EXP3
Número de spots
Volumen max
Log Volumen Ratio
EXP1 versus EXP3
Número de spots
Volumen max
Log Volumen Ratio

Fig. 4

A


8.7
3.8
2.9
2.8
1.8
1.5
1.2
1.5
1.4
0.9
0.7
1.2
0.9
0.9
0.6
0.6
0.5
0.5

B

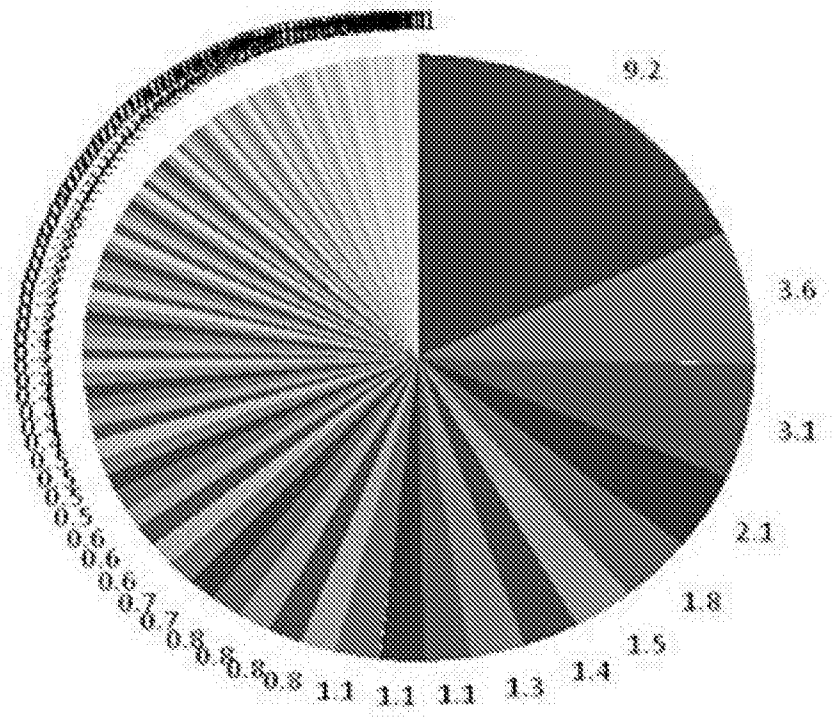

9.2
3.6
3.1
2.1
1.8
1.5
1.4
1.3
1.1
1.1
1.1
0.8
0.8
0.8
0.7
0.6
0.6
0.5
0.5

Fig. 5

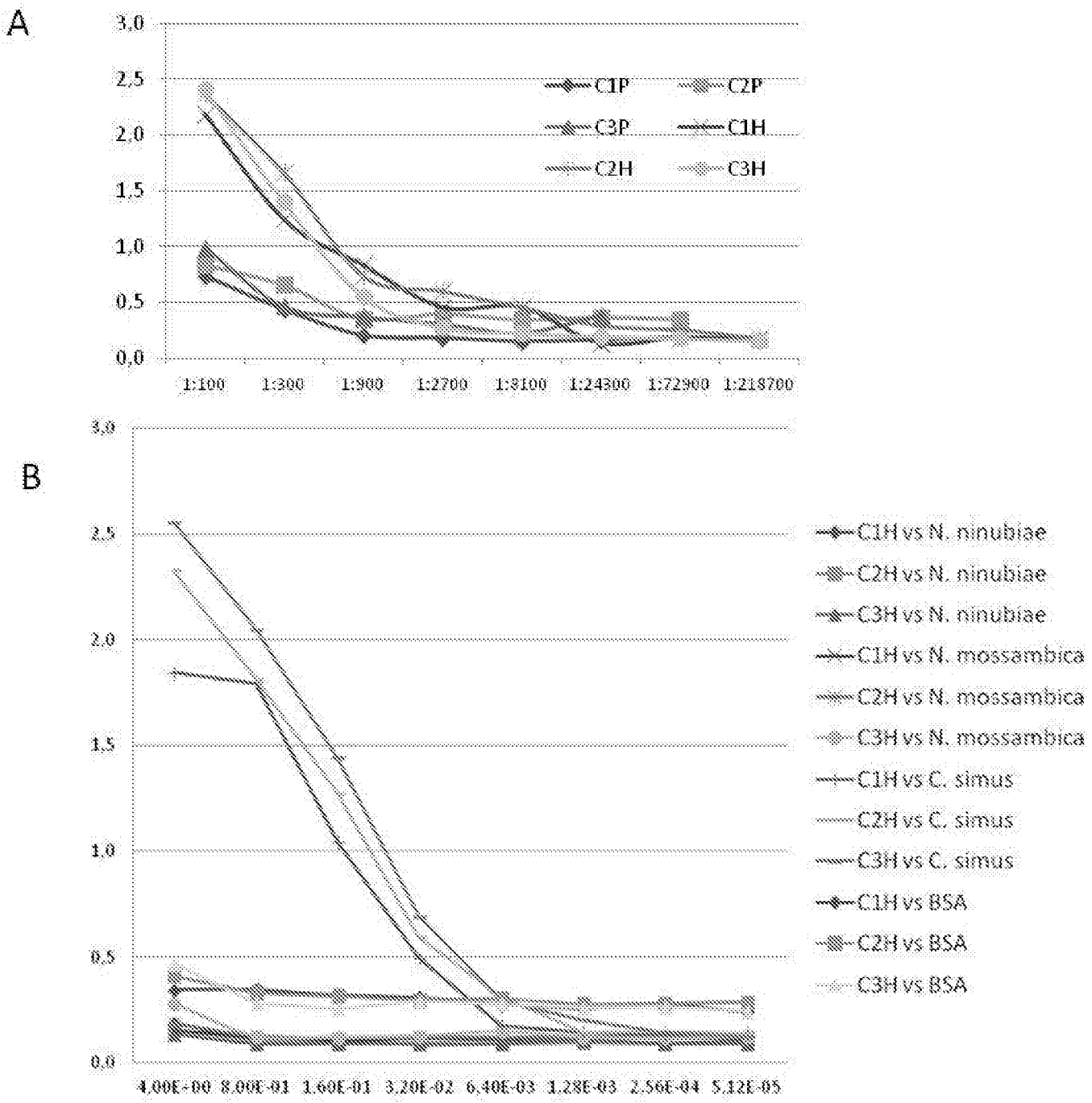

A
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
C1P
C2P
C3P
C1H
C2H
C3H
1:100
1:300
1:900
1:2700
1:8100
1:24300
1:72900
1:218700
B
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
C1H vs N. ninubiae
C2H vs N. ninubiae
C3H vs N. ninubiae
C1H vs N. mossambica
C2H vs N. mossambica
C3H vs N. mossambica
C1H vs C. simus
C2H vs C. simus
C3H vs C. simus
C1H vs BSA
C2H vs BSA
C3H vs BSA
4,00E-00
8,00E-01
1,60E-01
3,20E-02
6,40E-03
1,28E-03
2,56E-04
5,12E-05

Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/070653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/82 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004009618 A2 (CRUCELL HOLLAND BV ET AL.) 29/01/2004, claims.	1-22
A	US 2003028913 A1 (HEIN MICH B ET AL.) 06/02/2003, claims.	1-22
A	US 2005241023 A1 (HEIN MICH B ET AL.) 27/10/2005, claims.	1-22
A	US 2003208797 A1 (FRENKEN LEO G J ET AL.) 06/11/2003, claims.	1-22
A	US 2012034207 A1 (MCLEAN MICHAEL D ET AL.) 09/02/2012, claims.	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24/01/2014	**(28/01/2014)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer I. Rueda Molíns Telephone No. 91 3493279

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2013/070653

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2012034207 A1	09.02.2012	NONE	
WO2004009618 A2	29.01.2004	DK2314629T T3	20.01.2014
		US2013243773 A1	19.09.2013
		JP2011177193 A	15.09.2011
		US2011177073 A1	21.07.2011
		AU2010249150 A1	23.12.2010
		AU2010249150B B2	04.10.2012
		US2009263864 A1	22.10.2009
		US7927834 B2	19.04.2011
		US2007054362 A1	08.03.2007
		US7932360 B2	26.04.2011
		US2007077624 A1	05.04.2007
		US7429486 B2	30.09.2008
		HK1070902 A1	07.10.2011
		US2005170398 A1	04.08.2005
		US7262028 B2	28.08.2007
		US2005106722 A1	19.05.2005
		US8236561 B2	07.08.2012
		SI1523496T T1	30.11.2011
		PT1523496E E	29.09.2011
		NZ537277 A	30.04.2008
		JP2006515503 A	01.06.2006
		JP4836451B B2	14.12.2011
		ES2368733T T3	21.11.2011
		EP2314629 A1	27.04.2011
		EP2314629 B1	16.10.2013
		EP1523496 A2	20.04.2005
		EP1523496 B1	29.06.2011
		DK1523496T T3	17.10.2011
		CN101537180 A	23.09.2009
		CN1668636 A	14.09.2005
		CN100480260C C	22.04.2009
		CA2492377 A1	29.01.2004
		AU2003250074 A1	09.02.2004
		AU2003250074B B2	09.09.2010
		AT514717T T	15.07.2011
US2003208797 A1	06.11.2003	US2006037107 A1	16.02.2006
		EP1118669 A2	25.07.2001
		EP1118669 A3	29.08.2001
US2005241023 A1	27.10.2005	JP2005112857 A	28.04.2005
		JP4045268B B2	13.02.2008
		US2003172407 A1	11.09.2003
		US7282625 B2	16.10.2007
		US2003167534 A1	04.09.2003
		US7101688 B2	05.09.2006
		JP2001086891 A	03.04.2001
		JP3920545B B2	30.05.2007
		US6995014 B1	07.02.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2013/070653

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US7037722 B1	02.05.2006
		US2003028913 A1	06.02.2003
		US6852319 B2	08.02.2005
		US7005560 B1	28.02.2006
		US6417429 B1	09.07.2002
		US5959177 A	28.09.1999
		US5639947 A	17.06.1997
		WO9106320 A1	16.05.1991
		JPH05504333 A	08.07.1993
		JP3238700B B2	17.12.2001
		EP0497904 A1	12.08.1992
		EP0497904 A4	09.12.1992
		EP1048734 A2	02.11.2000
		EP1048734 A3	28.11.2001
		DE69033676T T2	09.08.2001
		DE69033676T T3	13.08.2009
		CA2071502 A1	28.04.1991
		AU6753290 A	31.05.1991
		US5202422 A	13.04.1993
US2003028913 A1	06.02.2003	JP2005112857 A	28.04.2005
		JP4045268B B2	13.02.2008
		US2005241023 A1	27.10.2005
		US2003172407 A1	11.09.2003
		US7282625 B2	16.10.2007
		US2003167534 A1	04.09.2003
		US7101688 B2	05.09.2006
		JP2001086891 A	03.04.2001
		JP3920545B B2	30.05.2007
		US6995014 B1	07.02.2006
		US7037722 B1	02.05.2006
		US6852319 B2	08.02.2005
		US7005560 B1	28.02.2006
		US6417429 B1	09.07.2002
		WO9742313 A1	13.11.1997
		JP2000510340 A	15.08.2000
		EP0946717 A1	06.10.1999
		EP0946717 A4	17.11.1999
		CA2253454 A1	13.11.1997
		AU731137B B2	26.11.1997
		AU2932397 A	26.11.1997
		US5959177 A	28.09.1999
		US5639947 A	17.06.1997
		WO9106320 A1	16.05.1991
		JPH05504333 A	08.07.1993
		JP3238700B B2	17.12.2001
		EP0497904 A1	12.08.1992
		EP0497904 A4	09.12.1992
		EP1048734 A2	02.11.2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2013/070653

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP1048734 A3	28.11.2001
		DE69033676T T2	09.08.2001
		DE69033676T T3	13.08.2009
		CA2071502 A1	28.04.1991
		AU6753290 A	31.05.1991
		US5202422 A	13.04.1993

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2013/070653

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
C12N15/82 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2004009618 A2 (CRUCELL HOLLAND BV ET AL.) 29/01/2004, reivindicaciones.	1-22
A	US 2003028913 A1 (HEIN MICH B ET AL.) 06/02/2003, reivindicaciones.	1-22
A	US 2005241023 A1 (HEIN MICH B ET AL.) 27/10/2005, reivindicaciones.	1-22
A	US 2003208797 A1 (FRENKEN LEO G J ET AL.) 06/11/2003, reivindicaciones.	1-22
A	US 2012034207 A1 (MCLEAN MICHAEL D ET AL.) 09/02/2012, reivindicaciones.	1-22

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
24/01/2014	**28 de enero de 2014 (28/01/2014)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado I. Rueda Molíns Nº de teléfono 91 3493279

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070653

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2012034207 A1	09.02.2012	NINGUNO	
WO2004009618 A2	29.01.2004	DK2314629T T3	20.01.2014
		US2013243773 A1	19.09.2013
		JP2011177193 A	15.09.2011
		US2011177073 A1	21.07.2011
		AU2010249150 A1	23.12.2010
		AU2010249150B B2	04.10.2012
		US2009263864 A1	22.10.2009
		US7927834 B2	19.04.2011
		US2007054362 A1	08.03.2007
		US7932360 B2	26.04.2011
		US2007077624 A1	05.04.2007
		US7429486 B2	30.09.2008
		HK1070902 A1	07.10.2011
		US2005170398 A1	04.08.2005
		US7262028 B2	28.08.2007
		US2005106722 A1	19.05.2005
		US8236561 B2	07.08.2012
		SI1523496T T1	30.11.2011
		PT1523496E E	29.09.2011
		NZ537277 A	30.04.2008
		JP2006515503 A	01.06.2006
		JP4836451B B2	14.12.2011
		ES2368733T T3	21.11.2011
		EP2314629 A1	27.04.2011
		EP2314629 B1	16.10.2013
		EP1523496 A2	20.04.2005
		EP1523496 B1	29.06.2011
		DK1523496T T3	17.10.2011
		CN101537180 A	23.09.2009
		CN1668636 A	14.09.2005
		CN100480260C C	22.04.2009
		CA2492377 A1	29.01.2004
		AU2003250074 A1	09.02.2004
		AU2003250074B B2	09.09.2010
		AT514717T T	15.07.2011
US2003208797 A1	06.11.2003	US2006037107 A1	16.02.2006
		EP1118669 A2	25.07.2001
		EP1118669 A3	29.08.2001
US2005241023 A1	27.10.2005	JP2005112857 A	28.04.2005
		JP4045268B B2	13.02.2008
		US2003172407 A1	11.09.2003
		US7282625 B2	16.10.2007
		US2003167534 A1	04.09.2003
		US7101688 B2	05.09.2006
		JP2001086891 A	03.04.2001
		JP3920545B B2	30.05.2007
		US6995014 B1	07.02.2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070653

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		US7037722 B1	02.05.2006
		US2003028913 A1	06.02.2003
		US6852319 B2	08.02.2005
		US7005560 B1	28.02.2006
		US6417429 B1	09.07.2002
		US5959177 A	28.09.1999
		US5639947 A	17.06.1997
		WO9106320 A1	16.05.1991
		JPH05504333 A	08.07.1993
		JP3238700B B2	17.12.2001
		EP0497904 A1	12.08.1992
		EP0497904 A4	09.12.1992
		EP1048734 A2	02.11.2000
		EP1048734 A3	28.11.2001
		DE69033676T T2	09.08.2001
		DE69033676T T3	13.08.2009
		CA2071502 A1	28.04.1991
		AU6753290 A	31.05.1991
		US5202422 A	13.04.1993
US2003028913 A1	06.02.2003	JP2005112857 A	28.04.2005
		JP4045268B B2	13.02.2008
		US2005241023 A1	27.10.2005
		US2003172407 A1	11.09.2003
		US7282625 B2	16.10.2007
		US2003167534 A1	04.09.2003
		US7101688 B2	05.09.2006
		JP2001086891 A	03.04.2001
		JP3920545B B2	30.05.2007
		US6995014 B1	07.02.2006
		US7037722 B1	02.05.2006
		US6852319 B2	08.02.2005
		US7005560 B1	28.02.2006
		US6417429 B1	09.07.2002
		WO9742313 A1	13.11.1997
		JP2000510340 A	15.08.2000
		EP0946717 A1	06.10.1999
		EP0946717 A4	17.11.1999
		CA2253454 A1	13.11.1997
		AU731137B B2	26.11.1997
		AU2932397 A	26.11.1997
		US5959177 A	28.09.1999
		US5639947 A	17.06.1997
		WO9106320 A1	16.05.1991
		JPH05504333 A	08.07.1993
		JP3238700B B2	17.12.2001
		EP0497904 A1	12.08.1992
		EP0497904 A4	09.12.1992
		EP1048734 A2	02.11.2000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070653

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		EP1048734 A3	28.11.2001
		DE69033676T T2	09.08.2001
		DE69033676T T3	13.08.2009
		CA2071502 A1	28.04.1991
		AU6753290 A	31.05.1991
		US5202422 A	13.04.1993