



No. 10-125899- -00003-0000

Fecha: 2010-12-30 12:28:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 74**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES**

1

SOLICITUD DE:☐ Corrección de Error Material☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTENombre: **TRANSACTIVA SRL**

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Italia.

Dirección: Via Jacopo Linussio, 51,
I-33100 Udine,
ItaliaDomicilio: Udine,
Italia

Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70

E-mail: clientes@cavelier.com**IDENTIFICACION**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 35.456.344 T. P. 23.555

4

Número de expediente: 10.125.899

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevos capítulos descriptivo y reivindicatorio compuesto por 31 reivindicaciones y solicito respetuosamente a Su Despacho tenerlos en cuenta para continuar con el trámite de la presente solicitud a favor del Solicitante.

6

Comprobante de pago No. 10-108,551 Fecha: 20 de diciembre de 2010

7

Anexos☒ Comprobante de pago de la tasa por \$114.000, por concepto de modificaciones.☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por☐ Poderes, si fuere el caso

8

NOMBRE: **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ** FIRMA: Luiz Clemencia SolerC.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

UN MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA HUMANA EN UNA PLANTA, EN PARTICULAR UNA ENZIMA LISOSOMAL RECOMBINANTE HUMANA EN UN ENDOSPERMO DE CEREAL

CAMPO DE LA INVENCION

El presente invento se refiere a la producción de enzimas lisosomales humanas recombinadas, en particular de beta-glucosidasa ácida (E.C.3.2.1.45), y de alfa-glucosidasa ácida (E.C. 3.2.1.20) mediante transformación y manipulación genética de plantas, llamadas especies cereales. Las especies esta invención se aplica preferentemente a *Oryza Sativa* L. (arroz cultivado) porque la fabricación de semillas industriales puede llevarse a cabo con la eliminación del germen y la capa aleuronica, precisamente partes de semilla que contiene la mayoría de los contaminantes de lípidos y proteínas.

La misma tecnología se puede aplicar para la expresión de endospermo específico de otras enzimas lisosomales humanas cuyo déficit o funcionalidad incompleta causa condiciones patológicas.

ESTADO DEL ARTE

Las enfermedades raras representan un grupo heterogéneo de desordenes que tienen una baja incidencia y prevalencia en la población.

Elas muestran un curso crónico y pueden tener consecuencias invalidantes graves o ser fatales.

Las enfermedades raras incluyen desordenes de almacenamiento lisosomal, que son causados por el déficit de enzimas lisosomales específicas o proteínas transportadoras. Esta clase de desordenes comprende, entre otros, enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick B, Mucopolisacaridosis I, II, IV. El enfoque terapéutico para estas enfermedades consiste en la administración intravenosa de la enzima faltante (terapia de remplazo enzimático, ERT). Por ejemplo, la enfermedad de Gaucher puede tratarse mediante infusiones regulares durante toda la vida de beta-glucosidasa acido humana. Sin embargo, esta terapia es muy costosa y además no es asequible para todos los pacientes. El alto costo de ERT esta sustancialmente determinada por dificultades en la producción de beta-glucosidasa acido por medio de cultivos de células humanas o de mamíferos.

Las hidrolasas lisosomales son unas enzimas difíciles de producir y esto sucede por muchas razones. En primer lugar, son necesitadas en cantidades pequeñas dentro de las células; por razones de ahorro de energía, su sobre expresión es prevenida por procesos regulatorios basado en mecanismos de retro alimentación. Los procesos regulatorios son sorprendentemente conservados entre especies y dificultan lograr cantidades de producción significativas de enzimas lisosomales recombinantes en los huéspedes genéticamente transformados. Un ejemplo bien conocido es la producción de beta-glucosidasa humana en células animales donde la proteína TCP80 inhibe de forma eficiente la traducción de la ARN beta-glucosidasa humana mensajera por la alteración de sus polisomas de enlace.

En segundo lugar, las enzimas lisosomales tienen una función catabólica sobre un rango de componentes celulares importantes y pueden causar daños o muerte a las células si no se desplazan correctamente en las células del huésped. En la naturaleza, estas enzimas son sintetizadas como precursores inactivos que se mueven hacia lisosomas en donde son convertidos en las formas activas correspondientes y mantenida en adelante bajo un confinamiento estricto. En las células animales de cultivo, las enzimas lisosomales recombinantes pueden ser ubicadas en los lisosomas o secretadas en el medio de cultivo; ambas soluciones son sin embargo menos que óptimas en términos de cantidades o costos de producción. En las plantas, la elección en el lugar de ubicación para las enzimas lisosomales recombinantes es altamente incierta debido a que las células de las plantas no tienen lisosomas. Por otro lado, ubicar equivocadamente las enzimas lisosomales en las células de las plantas es extremadamente en detrimento en los términos de la viabilidad de la célula o del comportamiento metabólico; de hecho, estas enzimas pueden ejercer sus funciones catabólicas sobre los componentes esenciales de la célula, por ejemplo la beta-glucosidasa puede recortar los glicolípidos que son los constituyentes del sistema de membrana de la célula.

Una vez que el problema de la fito toxicidad ha sido adecuadamente resuelto, las plantas que han sido genéticamente diseñadas pueden representar un sistema de producción alternativo para las enzimas lisosomales, tanto desde un punto de vista tecnológico como económico, ya que el cultivo de las plantas requieren materiales relativamente económicos e infraestructuras agrícolas que ya existen en el territorio.

En la WO-A-97/10353 (WO'353), la síntesis de las enzimas lisosomales, que comprenden la beta-glucosidasa ácida humana sus formas que han mutado, han sido reportados de forma exclusiva en la hoja y, en particular, en la hoja de las especies de biomasa tales como el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). La WO'353 describe un método problemático en el cual el alto contenido de agua en los tejidos de las hojas (lo que significa una alta dispersión de las proteínas de interés) y la presencia de un gran número de contaminantes de proteína, polifenoles, cauchos, exudantes, alcaloides tóxicos, contribuyen a complicar el proceso de la extracción y purificación de las enzimas.

En WO'353, la expresión de beta-glucosidasa acida sigue la transformación del tabaco con vectores de expresión que albergan el promotor MeGa (herida inducible, derivada del promotor del tomate HMG2) o el promotor CaMV 35S.

Esta último es un elemento bien conocido, ampliamente usado para el control transcripcional de gen de tipo constitutivo. En WO'353, se ha declarado que otros promotores constitutivos o inducibles pueden usarse para el mismo propósito.

Por lo que concierne a los promotores de daño inducible, en WO'353 su uso está estrictamente confinado a la hoja, y las plantas deben estar previamente lastimadas con el fin de expresar el beta-glucosidasa acido. La degradación preliminar determina un incremento en los costos, un manejo más complejo del proceso de producción y con toda probabilidad, una degradación parcial de la enzima por proteinasas normalmente residente en la vacuola o en otros compartimientos celulares, también como una contaminación más pesada del material dañado con bacterias y hongos.

Los promotores inducibles ligeros virtualmente considerados en WO'353 no están efectivamente expresados en tejidos más que en la hoja mesófilo, como las semillas y particularmente las semillas de cereal de plantas, debido a la falta de radiación luminosa transmitida y/o a la falta de factores transcripcionales normalmente presentes en los tejidos fotosintéticos.

Con relación a los promotores constitutivos, todos los ejemplos se refieren al promotor CaMV 35S, también en vista de su representatividad. Sin embargo, los experimentos han mostrado que la eficiencia transcripcional CaMV 35S es marginalmente baja en la semilla, a tal grado como para excluir cualquier interés en la síntesis de proteínas heterólogas. Esta afirmación es aun más valiosa en el caso de plantas monocotiledoneas como los cereales, donde su promotor parece menos apropiado para dirigir altos niveles de expresión de gen en los tejidos de la hoja también.

En WO-A-03/073839 (WO'839), se ha reportado que una codificación de gen para una forma mutada de beta-glucosidasa bajo el control del promotor CaMV 35S no está expresada en la semilla en los niveles detectables en ensayos inmunológicos llevados a cabo con un anticuerpo específico.

Por consiguiente, junto con lo que se afirma en WO'839, es posible concluir que la patente WO'353 no proporciona realmente las enseñanzas para realizar la producción de beta-glucosidasa ácido humano u otras enzimas lisosomales en tejidos diferentes de la hoja mesófilo y específicamente en la semilla.

Además, experimentos posteriores (Reggi y otros 2005, Plant Mol Biol 57: 101-113) han demostrado que la información dada en Wo'353 como para la producción de beta-glucosidasa en la hoja de tabaco permite obtener cantidades de enzimas por debajo del nivel la atracción industrial. Además, como se indica en Wo'353, las cantidades de enzima que pueden purificarse de la biomasa de la hoja son aun más pequeñas cuando se expresan en términos de actividad enzimática, apoyando la existencia de limitaciones tecnológicas en el sistema de expresión de la hoja, particularmente en conexión con el uso de promotores constitutivos.

En la WO'839, se presenta una solución probable a los problemas encontrados con la producción de beta-glucosidasa en las plantas. En particular, la WO'839 describe los resultados de la transformación del tabaco con un vector de expresión que contiene el gen codificando una forma mutada de la beta-glucosidasa operativamente ligada con el promotor de globulina de soya 7S y una codificación de la secuencia de nucleótido para el péptido de señal de la globulina de soya 7S. Por medios de ensayos inmunológicos, el polipéptido de interés es ciertamente detectado en los extractos crudos de semillas.

En la descripción WO'839, no se hace mención de los efectos fitotóxicos en las plantas de tabaco transformado o en sus progenies causadas por la acumulación de beta-glucosidasa acida en la semilla, por consiguiente el sistema puede parecer ser efectivo en la solución de problemas relacionados con la producción en las plantas de enzimas lisosomales y, en particular, beta-glucosidasa.

Sin embargo, experimentos posteriores llevados a cabo en la semillas producidas por transformadas plantas de tabaco reveló que la acumulación de beta-glucosidasa determina importantes repercusiones en la viabilidad de la semilla. En particular, se ha demostrado que, ya en concentraciones enzimáticas cercanas a 200 U/kg de semilla (1 U = cantidad de liberación de enzima un micromole de 4-metilumbelliferil-D-glucosido por minuto en 37°C, pH 5.9), hay anomalías reproductivas causadas por una baja viabilidad y una germinación interrumpida. Además, por encima de aproximadamente 500 U/kg de semilla, viabilidad de semilla es completamente afectada.

Experimentos adicionales llevados a cabo por el Aspirante han mostrado que la viabilidad de la semilla de tabaco transformada con la misma construcción citada en WO'839 no puede ser restaurada en alguna forma conocida.

Una investigación realizada por un microscópico de electrón ha revelado una desorganización y una desestructuración del sistema de membrana celular en la semilla inviable, confirmando la inhabilidad para obtener una progenie vital desde esas líneas transgénicas que pueden ser teóricamente explotadas para la producción industrial de la enzima. Posteriormente se verificó por la microscopía electrónica que el sitio de almacenamiento de las formas mutadas de la beta-glucosidasa correspondía a las vacuolas proteínicas de almacenamiento internas para las células parenquimáticas de embrión del tabaco.

En general, aunque en línea de principio las plantas que se necesitan para la producción de cantidades de enzima industrial podrían obtenerse por propagación in vitro de plantas elites, el uso de este sistema complicaría inevitablemente el ciclo de producción debido a la necesidad para un gran número de plantas para

ser trasplantadas en el campo en un tiempo relativamente corto. Con el fin de planear unas 60 toneladas de producción de semilla de tabaco transgénico para satisfacer la demanda de beta-glucosidasa humana de Italia, una inversión en al menos 150 hectáreas de tierra y , sobre todo en producción in vitro, aclimatación de invernadero y trasplantación de campo de al menos 9 millones de plantas de tabaco se necesitaría.

Con respecto a la administración del proceso y los asuntos económicos, es claramente una situación muy diferente de la que resulta de la difusión de semilla transgénica o sembrando en hileras angostas; estas operaciones posteriores, factibles solamente con semilla viable, permitirían también unas cuatro o seis veces más producción de semilla por unidad de área comparado con las cosechas de tabaco estándar en vista de la densidad de la planta mucho más alta. La consecución de una densidad de planta similar a la que se obtiene con la siembra directa es impensable por trasplantación dado que su costo sería insuficientemente compensado desde un punto de vista productivo; de hecho hay una proporción inversa entre la producción de la planta y un número de plantas por unidad de área.

En cuanto a los costos de micro propagación, cada planta debe ser manejada individualmente y esto, combinado con la muy baja cantidad de semilla (unos pocos gramos) producidos por cada planta de tabaco, disminuiría drásticamente los beneficios de explotar la plantas como sistemas huésped de producción de enzima lisosomal.

Por lo tanto, la WO'839 deja varios problemas esenciales sin resolverse:

- las enzimas lisosomales aún ejercen efectos fito tóxicos no deseados en las plantas, en particular en su comportamiento reproductivo, forzando a adaptar un procedimiento engorroso y costoso en la aplicación de la tecnología propuesta;
- las líneas productivas no pueden ser mantenidas y multiplicadas a través del proceso natural de la reproducción sexual y del cultivo de las progenies resultantes;
- es por lo tanto imposible establecer bancos de semillas maestros y bancos de semillas de trabajo como lo fue solicitado por la legislación nacional e internacional existente que se encarga de las buenas prácticas de manufactura de sustancias activas para usos terapéuticos;
- la reconstrucción de la ruta de producción en cada ocasión significaría probar nuevamente cada vez la semilla producida por cada planta transformada (por ejemplo unos pocos gramos) y acumulando las semillas seleccionadas pero esto es claramente inaceptable por todas las agencias de regulación tales como la EMA o la FDA;
- la propagación in vitro así como la crio preservación de las líneas productivas puede resultar en mutaciones o en la inestabilidad de las construcciones genéticas insertadas en el genoma de la planta.

En la WO'839 los ejemplos que tienen que ver con la construcción de los vectores de expresión para la producción de enzimas lisosomales siempre reportan el uso de promotores de proteína almacenados de plantas dicotiledóneas. Los ejemplos que tienen que ver con la expresión actual de las enzimas lisosomales están limitadas a una forma mutada de la beta-glucosidasa ácida y la planta huésped utilizada siempre es el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

Teniendo todo es en consideración, la WO'839 no provee las enseñanzas para la producción de enzimas lisosomales, y en particular de la beta-glucosidasa, en plantas ni tampoco dan la información como evitar, minimizar y sobrellevar los problemas y las consecuentes limitaciones relacionadas con expresión de tejido y con la ubicación subcelular de tales enzimas, y en particular de la beta-glucosidasa, en la semilla.

Otro problema más tiene que ver con la extracción y purificación de las enzimas lisosomales de la semilla de acuerdo con las enseñanzas contenidas en la WO'839. De acuerdo con la WO'839, las semillas deben ser homogeneizadas en nitrógeno líquido y el extracto crudo resultante parcialmente purificado por ultrafiltración y procesado a través de HPLC. Ninguno de estos métodos es novedoso y al mismo tiempo ninguno puede ser aplicado en la industria: de hecho, moler una muestra de semillas en un tapón con nitrógeno líquido no es viable si el volumen del tapón es inclusive ligeramente mayor que unos pocos litros; de forma similar, la ultrafiltración de grandes volúmenes de extracto crudo no puede ser llevado a cabo debido a que las membranas se obstruyen. Finalmente, los procedimientos HPLC no son aplicados de forma industrial debido al hecho de que sólo unas muestras mínimas pueden ser procesadas cada vez. Por lo tanto, la

WO'839 no contiene las enseñanzas para la producción industrial de las enzimas lisosomales en una forma purificada, lo cual es la única forma apropiada para el uso terapéutico. Realmente, en la WO'839 no se provee una demostración real de la purificación de enzimas a partir de las semillas, ni siquiera a una escala de laboratorio. En conclusión, a pesar de las sugerencias, la WO'839 no constituye una solución probable para la producción de beta-glucosidasa en las plantas, y mucho menos de otras enzimas lisosomales, y una persona con habilidad del arte muy seguramente no tendría éxito en la aplicación del invento de la WO'839, por lo menos en una escala industrial.

De forma similar a la WO'839, la solicitud de patente WO-A-00/04146 (WO'146), la cual describe la expresión de lactoferrina humana y de proteínas con una actividad enzimática genérica en la semilla de plantas, no provee ninguna enseñanza con respecto a la producción de enzimas funcionalmente activas, por lo menos de todas las enzimas lisosomales. En la WO'146, no se provee evidencia alguna para dar soporte a la efectividad del proceso de producción de enzimas y los problemas relacionados con estabilidad, conformación y funcionalidad de dichas enzimas son totalmente descuidados.

Un propósito del presente invento es llevar a cabo un método para la producción de enzimas lisosomales humanas recombinantes en un endospermo de un cereal, particularmente la beta-glucosidasa ácida y la alfa-glucosidasa ácida en el endospermo del arroz. El método recientemente inventado vence las dificultades propias de la situación técnicamente conocida, más específicamente:

- este permite una efectiva expresión de tejido y localización subcelular de las enzimas lisosomales, y, en particular, de beta-glucosidasa acida humana, dentro de la semilla;
- este permite la producción de enzimas lisosomales apropiadas para uso terapéutico;
- elimina el riesgo de fenómenos fitotoxicos;
- no afecta la viabilidad de la semilla;
- permite la creación de bancos de semillas maestros y de trabajo;
- permite el mantenimiento y multiplicación de las líneas productivas a través de la reproducción sexual;
- facilita tanto la extracción como la purificación de las enzimas
- es económicamente más conveniente;
- facilita enormemente el manejo del proceso de producción;
- elimina el riesgo de la degradación parcial de la enzima;
- reduce enormemente el nivel de contaminación de bacteria y hongos.

El Aspirante ha ideado, probado y representado la presente invención para sobrellevar los defectos del estado del arte y para obtener estos y otros propósitos y ventajas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El presente invento es establecido y caracterizado en las solicitudes independientes, mientras que las solicitudes dependientes relativas describen otras características de la invención o variantes o para la idea inventiva principal.

En concordancia con los objetivos arriba mencionados, un método para la producción de enzimas lisosomales humanas recombinantes, apropiadas para el uso terapéutico, en un endospermo de cereal, comprende:

- la construcción de un vector de expresión de una planta para la transformación de tal cereal, conteniendo una secuencia de nucleótido albergando los siguientes elementos:

i) el promotor 4 de glutelina de arroz (GluB4pro) como un promotor específico de endospermo corriente arriba del gen codificador de dicha enzima lisosomal;

ii) el líder conocido como LLTCK como una región 5' UTR;

iii) la secuencia PSGluB4 codificando un péptido de señal utilizado en el arroz para dirigirse hacia el precursor de la glutelina 4 dentro del retículo endoplásmico, dicho péptido de señal siendo apropiada para llevar a cabo una transferencia co-traslacional de la enzima lisosomal recientemente sintetizada dentro del lumen del retículo endoplásmico de las células de endospermo y para determinar la acumulación de dicha enzima lisosomal en un compartimiento de célula específico;

iv) una secuencia de nucleótido codificando la forma madura de la enzima lisosomal humana;

- v) una 3' UTR de origen natural o artificial;
- un paso de la transformación de la planta de cereal utilizando dicho vector, en donde la enzima lisosomal es obtenida y confinada en un endospermo, el cual eventualmente no es absorbido por el embrión, y la presencia de grandes cantidades de la enzima lisosomal en el endospermo no afecta de forma negativa la viabilidad de la semilla ni la velocidad de germinación;
- un paso de acumulación de enzimas lisosomales dentro del endospermo de la semilla de dicha planta de cereal.

El presente invento permite la acumulación de una enzima lisosomal humana recombinante heteróloga en tejidos de almacenamiento no pertenecientes al embrión de la semilla. El presente invento también favorece la acumulación de una enzima lisosomal humana recombinante con un alto potencial fitotóxico/desestructurante en tejidos de almacenamiento no pertenecientes al embrión de la semilla y espontáneamente intentando un proceso apoptótico al final del desarrollo.

Además, es posible acumular potencialmente proteínas fitotóxicas en tejidos no vitales, los cuales serán sujetos para una actividad hidrolítica intensa después la imbibición y germinación de la semilla.

Estas proteínas potencialmente peligrosas pueden acumularse dentro de las vacuolas de almacenamiento de proteína o cuerpos de proteínas sin estar en contacto con o atravesar la membrana celular.

La presente invención permite la producción de exactamente las secuencias de ácido amino propuesto más bien que las variantes no auténticas de la proteína caracterizada por la presencia de aminoácidos adicionales los cuales son inútiles si no potencialmente dañinos en términos de tráfico, estabilidad, actividad biológica y uso terapéutico de proteínas. La proteína sintetizada es ventajosamente acumulada en el endospermo dentro de las vacuolas de almacenamiento de proteína (PSVs) o cuerpos de proteínas (PBs). Puesto que la extractabilidad de proteína de PSVs o de PBs es más bien similar, la localización de dicha proteína en uno o el otro compartimiento subcelular citado anteriormente es indiferente en términos de la validez de la presente invención.

Una representación de este invento implica la construcción de un vector de expresión para la transformación de la planta de cereal la cual comprende una secuencia albergando los siguientes elementos:

- i) el promotor de glutelina de arroz 4 (GluB4pro) como un promotor específico de endospermo corriente arriba del gen codificador de dicha enzima lisosomal;
- ii) el líder conocido como LLTCK como una región 5' UTR;
- iii) la secuencia PSGluB4 codificando un péptido de señal utilizado en el arroz para dirigirse hacia el precursor de la glutelina 4 dentro del retículo endoplásmico, dicho péptido de señal siendo apropiada para llevar a cabo una transferencia co-traslacional de la enzima lisosomal recientemente sintetizada dentro del lumen del retículo endoplásmico de las células de endospermo y para determinar la acumulación de dicha enzima lisosomal en un compartimiento de célula específico;

- iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial codificando la forma madura de la enzima lisosomal humana recombinante;
- v) un 3' UTR de origen natural o artificial; y el uso de tal vector para la transformación de la planta de cereal.

Ventajosamente, la secuencia de nucleótido del vector de expresión es como se informa en SEQ ID N°:1.

De acuerdo con una representación de esta invención, el vector de expresión de introduce dentro de las cepas bacterianas, las cuales se usan directa o indirectamente para la transformación de la planta. Ventajosamente, la cepa bacteriana seleccionada pertenece a un grupo que comprende *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.

De acuerdo con una representación preferida, la cepa bacteriana se usa para la transformación de callos embriogénicos de arroz (*oryza sativa* ssp. *japonica*, CR variedad CR W3). De acuerdo con una ventajosa variante, la enzima lisosomal es la beta-glucosidasa acida humana. En otra variante, la enzima lisosomal es el alfa-glucosidasa acida humana.

Realmente, la presente invención es igualmente efectiva en la síntesis, extracción y purificación de cantidades significativas del precursor alfa-glucosidasa acido humano, el cual tiene una masa molecular, estructura y función que es completamente diferente de beta-glucosidasa acido.

De acuerdo con una representación, el presente invento comprende un tercer paso que consiste en la fabricación de semillas industriales.

De acuerdo con una solución, la fabricación industrial se diseña para quitar la cascara y blanquear la semilla madura en la cosecha con el fin de remover los componentes fibrosos, el germen y la capa aleuronica que contiene un número de contaminantes de la proteína.

De acuerdo con una representación posterior, la presente invención comprende un cuarto paso de purificación de la recombinante lisosomal humana recombinante. El paso de purificación preferiblemente consiste en una cromatografía de interacción hidrofóbica, una cromatografía de intercambio iónico y una filtración de gel, en ese orden. Sin embargo, el paso de purificación puede incluir, alternativamente o adicionalmente, la aplicación de resinas cromatográficas con una composición química y/o estructura y/o función similar a las indicadas en los ejemplos en lo sucesivo reportados, la modificación parcial de las condiciones de elución, la duplicación de un conducto, por ejemplo mediante la recarga de una fracción eluída dentro de una columna.

Con la invención presente la lisosomal humana recombinante enzima se purifica en cantidades las cuales son fácilmente más grandes que 100 U/kg de semilla, o aun por encima de 500 U/kg de semilla. Además, la enzima purificada es extremadamente activa, no presenta supresiones, adiciones o sustituciones de aminoácido, resultando en este aspecto perfectamente igual al homologo nativo humano. Por otra parte, la acumulación de la enzima en el endospermo no

determina alguna alteración de la viabilidad de la semilla o velocidad de la germinación.

El casete molecular usado para la producción de enzima es normalmente heredado por los progenies y, como cualquier factor Mendeliano, puede traerse para homosis o transferida por el cruce para otras líneas transformadas, favoreciendo en ambos casos un incremento en la producción de enzima.

El método relacionado con el presente invento, contrario a las tecnologías conocidas, es claramente innovador y ventajoso porque permite obtener líneas transgénicas, por ejemplo de arroz, las cuales son capaces de producir industrialmente cantidades relevantes de las enzimas lisosomales humanas recombinantes apropiadas para uso terapéutico, en particular la alfa o beta-glucosidasa ácida, mostrando no alteración al fenotipo normal (ambos en nivel macroscópico y microscópico) y en particular ninguna anomalía reproductiva o alteración en la viabilidad de la semilla y velocidad en la germinación, también con concentraciones de enzima mayores de 500 U/kg de semilla. El método también permite extraer y purificar la enzima en una forma completamente activa, manteniendo la secuencia de aminoácidos sin cambios en relación con la contraparte humana nativa.

Comprendidos en la presente invención esta una secuencia de nucleótidos expresión de secuencia de nucleótidos de enzimas lisosomales humanas recombinantes, apropiadas para uso terapéutico, en un endospermo de cereal; dicha secuencia de nucleótidos comprende los siguientes elementos:

- i) el promotor de glutelina de arroz 4 (GluB4pro) como un promotor específico de endospermo corriente arriba del gen codificador de dicha enzima lisosomal;
- ii) el líder conocido como LLTCK como una región 5' UTR;
- iii) la secuencia PSGluB4 codificando un péptido de señal utilizado en el arroz para dirigirse hacia el precursor de la glutelina 4 dentro del retículo endoplásmico, dicho péptido de señal siendo apropiado para llevar a cabo una transferencia co-traslacional de la enzima lisosomal recientemente sintetizada dentro del lumen del retículo endoplásmico de las células de endospermo y para determinar la acumulación de dicha enzima lisosomal en un compartimiento de célula específico;
- iv) una secuencia de nucleótidos de origen natural o artificial codificando la forma madura de la enzima lisosomal humana.
- v) un 3' UTR de origen natural o artificial.

De acuerdo con el presente invento, la secuencia del promotor de glutelina de arroz 4 (GluB4pro) está indicado en la SEQ ID N°: 2.

De acuerdo con una representación ventajosa, el 5' UTR ii) es la líder conocida como LLTCK, descrito en la aplicación de la patente PCT/EP2007/064590 y reportada en SEQ ID N°:3.

De acuerdo con la presente invención, la secuencia de nucleótidos de PSGuB4 codificando el péptido señal usado por el arroz para orientar el precursor de glutelina 4 en el retículo endoplasmático está indicado en la SEQ ID N°: 4

De acuerdo con una realización del presente invento, la secuencia de nucleótido del elemento iv) es la secuencia GCase, que codifica la forma madura del beta-glucosidasa ácido humano, como se indica en SEQ ID No: 5.

De acuerdo con la realización ventajosa del presente invento, el 3' UTR del elemento v) es el terminador NOS, la secuencia de la cual se indica en SEQ ID N°: 6. Alternativamente el terminador del gen GluB4 puede usarse.

De acuerdo con una realización del presente invento, la secuencia de nucleótidos completa del casete de expresión es la misma como se reporta en SEQ ID N°:1.

Comprendidos en la invención presente están las secuencias de nucleótidos complementaria a los anteriormente mencionados.

Comprendidos en la presente invención están las secuencias derivadas de procesos mutagénicos, tales como supresiones, inserciones, transiciones, transversiones de uno o más nucleótidos de las secuencias anteriormente mencionadas o de sus secuencias complementarias siempre y cuando estas mantengan su función..

Comprendidos dentro del presente invento están las secuencias de combinaciones anteriormente mencionadas codificando la forma madura de la beta-glucosidasa humana con elementos promotores y/o secuencias para la proteína que se dirige al retículo endoplasmático y/o regiones no traducidas en diferentes 5' y 3' desde aquellos reportados en las secuencias indicadas en SEQ ID N°: 1,

apropiadas para obtener la síntesis y acumulación de la enzima específicamente en el endospermo de la semilla, o con secuencias nucleótidos complementarias a dichas secuencias.

Comprendidos dentro del presente invento están las combinaciones de elementos i), ii), iii), iv) como se describió anteriormente con la enzima madura codificando las secuencias diferentes de las reportadas en SEQ ID N°: 1 por la presencia de mutaciones o poliformismos internos para las especies humanas o combinaciones hechas con sus secuencias complementarias.

Además, comprendidos dentro del presente invento están también las combinaciones de elementos i), ii), iii), iv) y v) como las mencionadas anteriormente con las secuencias que codifican las formas maduras o precursores de otras enzimas lisosomales, o combinaciones hechas con sus secuencias complementarias.

Además, están comprendidas dentro del presente invento las combinaciones ya mencionadas, en las cuales la enzima es la alfa-glucosidasa acida humana.

Dentro del presente invento esta también una secuencia ya mencionada anteriormente en la cual las plantas transformadas son cereales.

Comprendido dentro del presente invento esta un vector molecular para la expresión de una enzima lisosomal humana en un endospermo de planta,

albergando dicha secuencia de nucleótido. Típicamente, el vector de expresión molecular es un plásmido.

De acuerdo con una solución ventajosa, la enzima lisosomal es la beta-glucosidasa acida humana.

Alternativamente, la enzima lisosomal es la alfa-glucosidasa acida humana.

Dentro del presente invento está comprendido también el uso del vector de expresión anteriormente mencionado para la transformación de la planta con el objetivo de producir una enzima lisosomal humana.

Dentro del presente invento esta también contenido una cepa bacteriana que contiene vectores de expresión como se describió anteriormente. Ventajosamente, esa cepa bacteriana puede escogerse de un grupo que comprende *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.

Comprendidas dentro del presente invento están las células de las plantas transformadas con vectores de expresión como las citadas anteriormente.

De acuerdo con una solución del presente invento, esas células son células de cereales preferiblemente pertenecientes a arroz cultivado (*Oryza sativa* L). Hay una preferencia de variedades de arroz no apropiadas para usarse como alimento. Por lo tanto, comprendido dentro del presente invento esta el uso de arroz de cera,

industrialmente explotado para la extracción y producción de almidón y sus derivados.

Alternativamente, las células pueden pertenecer a un miembro de la familia de las *Gramináceas* (*Poaceae*), por ejemplo maíz (*Zea mays* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum* spp.).

Comprendido dentro del presente invento está también la semilla dentro de una planta transformada por la expresión de una enzima lisosomal humana, que contiene un vector de expresión como se describió anteriormente.

De acuerdo con una solución del invento, la semilla de la planta transformada pertenece a una especie de cereal, preferiblemente la planta transformada pertenece a la especie de arroz *Oryza sativa* L.

El campo de protección relacionado con el presente invento también comprende una planta transformada para la expresión de una enzima lisosomal humana, obtenida con el uso de un vector de expresión como se mencionó anteriormente. Ventajosamente, tal planta es un cereal, preferiblemente perteneciente a la especie de arroz *Oryza sativa* L.

Están también comprendidas dentro del presente invento las progenies obtenidas por auto fertilización o cruce, o líneas transformadas seleccionadas de la planta transformada anteriormente mencionada.

El presente invento también se refiere a una semilla descrita anteriormente para tratamiento terapéutico. Por otra parte, la invención también se refiere al uso de la semilla ya mencionada para la producción de una droga ERT. En particular, esto se refiere a la terapia de reemplazo enzimático para las siguientes enfermedades: enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad Nicmann- Pick B, Mucopolisacaridosis I, II, IV.

La invención también se refiere a una semilla citada anteriormente que se usa en la terapia de reemplazo enzimático. En particular, la invención se refiere a una semilla mencionada anteriormente usada en la terapia de reemplazo enzimático de las siguientes enfermedades: enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad Nicmann- Pick B, Mucopolisacaridosis I, II, IV.

BREVE DESCRIPCION DE LOS ESQUEMAS

Estas y otras características de la presente invención llegarán a evidenciarse desde la siguiente descripción de una forma preferencial de la representación, dado como un ejemplo no restrictivo con referencia a los esquemas adjuntos en donde:

- La Figura. 1 es un esquema de un vector de expresión final Psv2006 [GluB4pro/LLTCK/PSGluBa/GCasc/NOster] usado para la producción de endospermo específico de la enzima beta-glucosidasa acida humana;

- La Figura 2A muestra un esquema experimental del método para la síntesis por el recursivo –PCR del líder LLTCK bajo el promotor GluB4;
- La Figura 2B muestra los resultados de los análisis electroforéticos de los productos dúplex –PCR obtenidos del ADN genómica extraído desde las plantas supuestamente transformadas con parejas de cebadores reconociendo el GCase y los genes *HPT II*. Línea 1: escalera de 8 1Kb (NEB); línea 2: control negativo (NC), precisamente ADN genómica extractado de una planta no transformada; línea 3: control positivo (PC), precisamente el vector pSV2006 [GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] ; líneas 4-16: plantas probadas;
- Las Figuras 3A y 3B muestran los resultados de SDS-PAGE (A) y transferencia de Western (B) análisis llevados a cabo en extractos de proteínas obtenidas en el curso de los ensayos de extracción de semillas de transformantes GCase. En A y B, las líneas 1-5 están cargadas con extracciones consecutivas seriales de la muestra de arroz blanqueado, las líneas 6 y 7 con dos extracciones consecutivas de residuos del blanqueamiento.

El Control positivo (PC): en transferencia de Western que corresponde a 100 ng de imiglucerasa purificada. Es evidente que la mayor parte de la beta-glucosidasa ácida humana recombinante contenida en el arroz blanqueado puede recuperarse con tres extracciones seriadas;

- La Figura 4A muestra los resultados del análisis de transferencia de Western realizados en los extractos de proteína que se obtienen de la semilla de GCse

transformantes. Línea 1: marcador estándar Precisión Plus Protein (BioRad); línea 2: control positivo (PC, 100 ng imiglucerasa); línea 3: control negativo (NC, extracto de proteínas de arroz no transformado, variedad CR W3); líneas 4-10: extractos de proteínas de las semillas de diferentes transformantes primarios;

- La Figura 4B muestra tres glicofomas de beta-glucosidasa acida humana detectadas con el análisis de transferencia de Western después de una electroforesis de 2 dimensiones de un extracto de proteína de semilla de una planta transformada GCase;
- Las figuras 5A y 5B reportan una imagen de inmunolocalización obtenida por un microscopio electrónico de transmisión (magnificación 12500X) en una sección de semilla de un arroz no transformado (A) y un GCse transformante (B). Es evidente que la acumulación de beta-glucosidasa acida humana recombinante implica solamente vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSVs);
- Las Figuras 6A y 6B muestran un ejemplo de cromatogramas HIC(A) y IEC (B) donde los picos de elución contienen la beta-glucosidasa acida humana recombinante que están indicados;
- La Figura 7 reporta en un gráfico la fluorescencia registrada en los ensayos 4-MUG realizadas con diferentes alícuotas cromatografías relativas a NC (planta no transformada) y un transformante GCase. Los resultados de los análisis

asociados de transferencia de Western se reportan también. EX: extracto crudo; R: flujo a través de; E: alícuotas de elución, PC: control positivo (imiglucerasa). Es evidente que la verdadera actividad GCase (E2- E3) puede estar separada del endógeno GCase como un (E6) con IEC;

- Las figuras 8A y 8B muestran los resultados de un análisis SDS- PAGE (A) realizada en beta-glucosidasa acida humana recombinante después del paso de purificación final con la filtración del gel y la correspondiente señal de transferencia de Western (B);
- La Figura 9 reporta el espectro de masa obtenido por el análisis MALDI- TOF en una muestra purificada GCase por HIC y IEC;
- La Figura 10 muestra una representación esquemática del gen GAA reuniendo en pUC18 a partir de los fragmentos iniciales sintetizados artificialmente;
- La Figura 11 muestra una representación esquemática de la estrategia adoptada para alcanzar el vector de expresión final Psv2006 [GluB4pro/LLTCK/GAA/NOSter];
- La Figura 12 muestra los resultados de un análisis de transferencia de Western realizados en los extractos de proteína total obtenida de diferentes transformantes GAA. Línea 1: M, marcador Precision Plus Protein estándar (BioRad); línea 2: NC (extracto de proteína de semilla de una planta no

transformada); línea 3: PC (100 ng de Myozyme); líneas 4-10: extractos de proteínas de semilla obtenidas de diferentes transformantes primarios;

- La Figura 13 muestra los resultados de un etiquetado inmuno oro de endospermo de semilla madura llevado a cabo con un anticuerpo – GAA. Es evidente que GAA es específicamente detectado en las vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSVs) y no en los cuerpos de proteínas (PBs). Ninguna señal fue alguna vez detectada en el control negativo (semilla producida por una planta no transformada) (datos no mostrados). Magnificación 16000X.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION PRESENTE

La presente invención se refiere, en particular, a un método para la producción de beta-glucosidasa acida humana en el endospermo de una semilla de arroz cultivado (*Oryza sativa L.*); el método comprende:

- Un primer paso de transformación de la planta por la cual la enzima lisosomal humana combinante es obtenida y confinada en un endospermo, el cual no está eventualmente absorbido por el embrión, y la presencia de grandes cantidades de la enzima lisosomal en el endospermo no afecta negativamente la viabilidad de la semilla y la velocidad de la germinación;
- el uso, en el primer paso de la transformación de la planta, de un promotor de endospermo específico bajo el gen que codifica dicha enzima lisosomal, y de un péptido señal para una transferencia co- translacional de la nueva enzima

lisosomal sintetizada dentro del lumen del retículo endoplásmico de las células del endospermo para su acumulación de tejido específico;

- una segunda fase de la acumulación de proteína dentro del endospermo de semilla de una planta.

En el método de transformación de la planta, el uso de un vector de expresión que contiene los siguientes elementos está previsto:

- i) un promotor de endospermo específico de origen natural o artificial;
- ii) un 5' UTR de origen natural o artificial;
- iii) una secuencia de nucleótidos de origen natural o artificial que codifica un péptido señal apropiada para dirigir la enzima lisosomal recombinante dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y para determinar la acumulación de dicha enzima lisosomal en un tejido específico.
- iv) una secuencia de nucleótidos de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la enzima lisosomal humana;
- v) un 3' UTR de origen natural o artificial.

La secuencia de nucleótidos contenida en el vector de expresión es, por ejemplo, la que se indica en SEQ ID N°: 1.

Entre los promotores posiblemente conocidos promotores de endospermo específico de plantas Gramináceas y en particular del arroz, el presente invento explota ventajosamente el promotor del gen GluB4 (la secuencia del cual se reporta en SEQ ID N°:2), porque la enzima lisosomal codificada GluB4 presenta

una distribución más uniforme dentro del endospermo de la semilla. Por otra parte el promotor GluB4 tiene una más alta actividad transcripcional comparado con el promotor de genes que codifica otras proteínas almacenadas dentro del endospermo del arroz, como globulinas, prolaminas, u otras que no sean glutelinas GluB4.

El promotor GluB4 fue aislado por el PCR del de la variedad de arroz ceroso CR-W3 (seleccionado por Ente Nazionale Risi, Milan) junto con su región líder. Puesto que el líder natural es más bien corto y escaso en elementos repetidos CAA y CT, los cuales tienen una influencia positiva en la expresión del gen, este fue eventualmente substituido con el 5' UTR conocido como LLTCK (De Amicis y otros. 2007, Transgenic Res 16: 731-738) y reportado en la aplicación de la patente internacional PCT/EP2007/064590 e indicada en SEQ ID N°: 3.

La secuencia GluB4pro/LLTCK estaba ligada con PSGluB4/GCase, donde:

- PSGluB4 es la secuencia (como se indica en SEQ ID N°:4) codificando el péptido señal usado por el precursor glutelina 4 de arroz para entrar al retículo endoplasmático;
- GCase es la secuencia (como se indica en SEQ ID N°:5) codificando la forma madura de la beta-glucosidasa acida humana; la forma madura se compone de la proteína precursora privado del péptido señal nativo.

Con el fin de evitar la adición de aminoácidos extrajeros en el N- termino de la proteína madura, el cual podría resultar de la introducción de la restricción de la endonucleasa sitios eventualmente usados para la clonación o conexión de

secuencia, la región ADN correspondiente a la secuencia PSGluB4 y la parte inicial GCase madura secuenciada de codificación (hasta la ocurrencia natural sitio de restricción Hind III) fue artificialmente sintetizado.

La secuencia resultante PSGluB4 de tal síntesis no coincide con la secuencia del arroz natural, aunque es completamente idéntico debido a los cambios que han sido deliberadamente introducidos para favorecer un mejor reconocimiento del codón de inicio de la traducción en asociación con LLTCK y para evitar la existencia de codones raros o contextos de intercodón desfavorable.

Por el contrario, la parte inicial GCase se conservó inalterada con relación a la secuencia natural humana, así que la secuencia GCase corresponde exactamente al acceso GenBank N° M16328, en el intervalo entre las posiciones de nucleótidos 553 y 2046. Después de la conexión de la secuencia sintética con esa codificación de la parte restante de la enzima a través del sitio de restricción el Hind II, el complejo completo se ligó al termino 3' de GluB4pro/LLTCK, previamente clonado en el vector binario pSV2006. pSV2006 fue desarrollado por el Aplicante de plásmido pCAMBIA 1300 (www.cambia.org); la señal de poliadenilación usada por la construcción de beta-glucosidasa acida humana fue NOS ter, precisamente el terminador del gen de sintasa nopalina *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia del terminador NOS se reporta en SEQ ID N°:6.

Después de chequear todas las secuencias usadas en la construcción del vector final pSV2006 [GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOster] (fig. 1), este sector fue introducido dentro de la cepa EIIA 105 del *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Luego, la cepa de ingeniería se usó para la transformación de los callos embriogénicos de arroz (*Oriza sativa* ssp. Japonica, variedad CR W3). El

procedimiento completo de la transformación de la planta y la regeneración del medio selectivo fue regularmente completado. No se observaron diferencias entre las plantas transformadas y controladas cultivadas en cámaras climáticas bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad. La fertilidad del órgano masculino y femenino y el porcentaje de aborto de flores en las plantas transgénicas se encontró comparable con el observado en las plantas no transformadas de la variedad CR W3. Todos los transformantes primarios produjeron semillas con una viabilidad media superior al 95% con independencia del nivel de expresión de beta-glucosidasa acida humana. Además, la velocidad de la germinación igualó los valores máximos de las especies (dentro de 4-6 días casi toda la semilla viable desarrolló raíces primarias y el coleóptilo).

Similarmente a los transformantes primarios, también sus progenies crecieron normalmente y produjeron semillas que contenían beta-glucosidasa acida recombinante humana. La presencia del gen que codifica la enzima se verificó por el análisis PCR en todas las plantas transformadas supuestamente (fig. 2B) y en más de 150 progenies de un muestreo aleatorios de los mejores transformantes primarios obtenidos por autofecundación. En estos análisis los controles positivos y negativos, corresponden respectivamente a un total ADN de plantas no transformadas CR W3 y fueron usadas para la mini preparación de extracciones del vector de expresión. Además, también fue demostrada la amplifiabilidad de cada extracto de ADN probado, haciendo uso de una primera pareja específica diseñada en una región cloro plástica del arroz ADN. En su conjunto, el análisis PCR demostró que el genoma del arroz es transformado codificando la enzima beta-glucosidasa acida humana y el transgen es transmitido a la descendencia. La transmisión hereditaria se demostró no solamente en las progenies auto fecundadas sino también en las derivadas a través del cruce de plantas

transformadas con controles negativos o con otras plantas transformadas. Con el fin de verificar la producción del mensajero de beta-glucosidasa acida humana RNA, se cosecharon las semillas de arroz maduro (10-15 días después de la florescencia) y se usaron para una extracción total de RNA. Posteriormente se realizaron los siguientes análisis: a. ausencia del ADN genómico contaminación por PCR; b. amplificación de la beta-glucosidasa acida humana mensajero RNA por RT-PCR; c. amplificación de la glutelina 4 mensajero RNA y RT-PCR. En todos los casos, el gen GCase apareció regularmente expresado y mostró el mismo modelo de expresión de la codificación del gen la glutelina 4 proteínas de almacenamiento. Como se esperaba, cuando el total RNA del control negativo se uso, solamente se obtuvo la amplificación del gen glutelina 4

La semilla inmadura también se uso para inmunolocalizar la proteína recombinante por microscopía electrónica de transmisión. Este trabajo demostró que la beta-glucosidasa acida humana esta acumulada exclusivamente en las vacuolas de almacenamiento de proteína de las células del endospermo. Cuando se repitió el mismo análisis en la semilla de control CR-W3, no se obtuvo ninguna señal; esto demostró la gran efectividad del análisis y la especificidad absoluta del anticuerpo GCase que nosotros usamos. La disponibilidad de un anticuerpo específico junto con la posibilidad de medir la actividad de la beta-glucosidasa a través de un ensayo fluorimétrico fiable y sensible se explotó para seleccionar las mejores líneas transgénicas y desarrollar un procedimiento de purificación de la enzima lisosomal recombinante. Relativas a los procesos de extracción y purificación, se desarrollaron protocolos para la elaboración preliminar de la semilla, extracción de proteína cruda y aislamiento y purificación de beta-glucosidasa acida recombinante. El protocolo de purificación consta de una serie

de tres etapas: una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) una cromatografía de intercambio catiónico (IEC) y un gel de filtración (GF).

Las semillas descascaradas y blanqueadas fueron completamente útiles para remover una gran parte de los contaminantes de la proteína con una pérdida mínima GCase. Las pérdidas fueron también muy bajas durante las etapas de extracción. La remoción de la enzima endógena como GCase, responsable para una actividad como GCase, se obtuvo a través de un proceso de elución discontinua aplicado al final de una cromatografía de intercambio catiónico. Esta cromatografía permitió una nueva disminución de contaminantes de la proteína asignando a la etapa de filtración del gel el papel de pulido de la muestra.

En SDS-PAGE, la proteína purificada mostro esencialmente la misma movilidad de la imiglucerasa (La imiglucerasa es un medicamento utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.) (Cerezyme, Genzyme Corp) y un aparente peso molecular de aproximadamente 60 kDa. En la transferencia de Western, fue fuertemente detectada la proteína purificada por un anticuerpo contra imiglucerasa en los conejos. La proteína purificada se encontró para ser enzimáticamente activa; en particular, de manera eficiente hidroliza el sustrato fluorogénicos 4 metilumbeliferil beta-glucosidasa D, mostrando la misma reacción cinética de imiglucerasa. En electroforesis 2D, la única banda repetidamente detectada en los análisis de transferencia de Western llevados a cabo después de la división estándar SDS-PAGE en al menos tres glicoformas de proteínas. Además el análisis demostró la integridad de la beta-glucosidasa acida recombinante humana producida en el endospermo del arroz y la identidad de su secuencia de aminoácido con la contraparte humana natural.

El termino N-microsecuenciamiento (secuencia de muy pocas cantidades de proteína) demostró que el nonapeptido inicial corresponde a ARPCIPKSF el cual es también el N- termino beta-glucosidasa acido natural humano. La masa péptida de huellas digitales ejecutada en MALDI-TOF mostró que también el termino C de la proteína está completamente conservado y que, similarmente a lo que fue observado en la enzima natural, no se encontraron cadenas de glicanos en el quinto sitio de glicosilacion. Diferentemente, el sitio primero, segundo, tercero y cuarto de N glicosilacion de la proteína pareció ser ocupado. La presencia de N- glicanos en el primer sitio es esencial para la actividad enzimática de la proteína.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción del casete molecular para expresión GCase

La siguiente sección describe un método para la expresión endospermo específico de beta-glucosidasa ácida humana en el arroz. Métodos similares pueden usarse para llevar a cabo variantes de la construcción, caracterizados por la presencia de otros promotores y/o secuencias de endospermo específico para la orientación de proteína en el retículo endoplásmico.

Aislamiento del promotor Glutelina 4 (GluB4pro)

Para aislar el promotor Glutelina 4 de *Oryza sativa* (GenBank acc. N. AY427571), un PCR (Polymerase chain reaction: reacción en cadena) en ADN genómico de la variedad CR W3 fue ejecutado. En tal PCR, los siguientes cebadores fueron usados:

Cebador GluB4pro for (iniciador hacia adelante): como indicado en la secuencia SEQ ID No: 7.

Cebador GluB4pro rev (iniciador reverso): como indicado en la secuencia SEQ ID No: 8.

Para favorecer la subsecuente clonación, el cebador GluB4pro for fue diseñado para insertar los sitios de restricción *Sph* I y *Eco* RI en el extremo 5' del amplicón; de manera similar, el cebador GluB4pro rev fue diseñado para introducir un sitio *Xba* I en el extremo 3' del producto PCR.

Ciclo: 95°C para 2'; 40X (95°C para 45"; 63°C para 40"; 72°C para 2'); 72°C para 5'. El producto amplificado fue clonado en pGEM-T (Promega) y completamente secuenciado.

Substitución de líder nativo con líder artificial LLTCK en el promotor GluB4

Para substituir el líder nativo del promotor Glutelina 4 del arroz (GluB4 pro) con el líder sintético LLTCK (De Amicis y otros, 2007, Transgenic Res 16: 731-738), tres PCR seriales fueron ejecutados con apropiados cebadores (un cebador iniciador hacia adelante y tres cebadores iniciador reverso) de acuerdo con el esquema de la Figura 2A.

En el primer PCR, el pGEM-T[GluB4pro] plásmido fue usado como plantilla; en los siguientes dos, las plantillas fueron el producto de la reacción previa. El cebador iniciador hacia adelante 1 inicia con un sitio de restricción *Bfr* I y recuece cerca al extremo 3' de la secuencia GluB4 pro. El cebador iniciador reverso 1 recuece con

su extremo 3' al GluB4 pro región inmediatamente contracorriente de la región líder. La parte que no se recuece contribuye a la síntesis del tracto LLTCK inicial. El cebador iniciador reverso 2 recuece el último fragmento y determina la síntesis de la segunda parte de la secuencia líder LLTCK. Finalmente, el cebador iniciador reverso 3 introduce la porción terminal de la secuencia LLTCK también como un sitio *Xba* I en el borde 3'. Reacciones PCR fueron llevadas a cabo usando el Accu Taq (Sigma) ADN polimerasa y los siguientes ciclos de temperatura: 98°C para 2', 15 (PCR I y II) o 25 (PCR III) X (94°C para 30"; 65°C para 30"; 68°C para 1'); 68°C para 10'.

El producto PCR final fue clonado en pGEM-T y verificado por digestión enzimática y secuenciamiento. Para reemplazar la secuencia líder nativo GluB4pro con el líder LLTCK artificial, los sitios de restricción *Bfr* I y *Xba* I fueron usados. Vector e inserto fueron ligados con la ligasa T4 ADN y el vector resultante pGEM-T[GluB4pro/LLTCK] fue verificado por análisis PCR y digestión enzimática.

Substitución del péptido señal nativa con SPGluB4

Para incrementar la expresión GCCase en arroz, la secuencia de nucleótidos que codifica la señal péptida de glutelina 4 (SPGluB4) fue optimizada en la base del uso del codón de arroz y puso en frente de la codificación de secuencia la forma madura de beta-glucosidasa ácida humana.

Para prevenir la adición de amino ácidos ajenos en el N-termino de la enzima madura, la adición de sitios de restricción de endonucleasa de espurio en los bordes para ser conectados fue evitada. Para solucionar el problema, un fragmento artificial incluyendo un sitio *Xba* I en el extremo 5', la secuencia SPGluB4 y la región inicial GCCase hasta el sitio *Hind* III de origen natural fue

producido y clonado en pUC57 (Fermentas). Después de un chequeo de la secuencia, este fue clonado en lugar del fragmento codificando el péptido señal nativa dentro de pGEM-T[GCase], ciertamente el plásmido que contiene la secuencia entera codificando la beta-glucosidasa ácida humana como se reportó en GenBank No. M16328. Ambos, pUC57[SPGluB4] y pGEM-T[Gcase] fueron digeridos con *Xba* I y *Hind* III para generar el eje central de inserto y vector, respectivamente. Estas partes fueron unidas con ligasa ADN T4 para producir pGEM-T[SPGluB4/GCase] el cual fue chequeado por digestión enzimática.

Montaje del casete molecular para la expresión beta-glucosidasa ácida humana en el arroz

Las regiones que corresponden a GluB4pro/LLTCK y SPGluB4/GCase fueron subclonadas en dos pasos en PUC18[NOSter]; este plásmido fue derivado de pUC18 (farmacia) por inclusión de la secuencia de poliadenilación NOS de *Agrobacterium tumefaciens*. Para este propósito, los sitios de restricción introducidos en los extremos 5' y 3' de cada región fueron explotados, a saber *Sph* I y *Xba* I para GluB4for/LLTCK, *Xba* I y *Sac* I para SPGluB4/GCase.

Producción del vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/SPGluB4/GCase/NOSter]

Para obtener el vector de expresión final, pSV2006 (un derivado pCAMBIA 1300) fue usado. A través de la digestión de *Eco* RI, el casete de expresión original de pSV2006 y la construcción molecular contenida en pUC18[GluB4pro/LLTCK/SPGluB4/GCase/NOSter] fue removida. El eje central pSV2006 y el inserto de interés fueron ligados el uno con el otro para obtener el vector de expresión final (Figura 1), el cual fue sujeto de análisis específico antes de su transferencia en *Agrobacterium tumefaciens*, colar EHA 105 por

electroporación. La cepa ingeniería *Agrobacterium tumefaciens* fue usada para transformación de *Oryza sativa* ssp. *Japonica*, variedad CR W3.

Ejemplo 2: transformación del arroz vía *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación del arroz se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo de Hiei (Hiei y otros, 1994), modificado por C. Hoge (Rice Research Group, Institute of Plant Science, Leiden University) y E. Guiderdoni (Biotrop program, Cirad, Montpellier, France). Las fases principales del procedimiento están brevemente reportadas abajo:

Desarrollo de callo embriogénico

La transformación de arroz fue ejecutada usando callo embriogénico derivado de escutelo. Para inducir proliferación de callos desde el tejido escutelo, semillas de arroz fueron descascaradas, desinfectadas para eliminar patógenos potenciales y contaminantes saprofitos, lavadas varias veces con agua destilada estéril, secadas en papel secante estéril y transferidas a platos de petri que contienen el medio de inducción de callos (CIM). Los platos fueron encubados a 28°C por 7 días en la oscuridad; después de este periodo, scutelli fueron extirpados de la plántula y cultivados en un CIM por 14 días a 28°C en la oscuridad. Al final del periodo de inducción, masas de callos fueron seleccionados sobre la base de la presencia de un diminuto callo blanco. Estos últimos fueron transferidos a un fresco CIM y cultivados por 10 días para desarrollar callos embriogénicos apropiados para transformación.

Co-cultivo de callo con *Agrobacterium tumefaciens*

Para obtener una cantidad suficiente de *Agrobacterium tumefaciens* para transformación, la pulpa que alberga el vector de expresión fue encubada por 3 días a 30°C en agar LB. La capa de células agrobacterium fueron recolectadas y resuspendidas en el medio de co-cultivo líquido (CCML) hasta que un O.D.₆₀₀ de 1.00 fue alcanzado (aprox. $3\text{-}5 \times 10^9$ células/mL). El mejor callo, precisamente esos compactos, de color blancos y con 2 mm de diámetro, fueron sumergidos en la suspensión bacteriana. Después de la transferencia en papel Whatman estéril, los callos fueron transferidos a un medio de co-cultivo (CCMS) a una densidad de 20 por plato de Petri de altura de borde (sarstedt) y encubados por 3 días a 25°C en la oscuridad.

Selección de callos resistentes a la higromicina

Al final del periodo de co-cultivo, los callos fueron transferidos a un medio de selección I (SMI) y encubado a 28°C para dos semanas en la oscuridad. Los callos fueron eventualmente transferidos a un medio de selección II (SMII) y encubado por otra semana en las mismas condiciones.

Regeneración de planta desde callos transformados

La regeneración de plantas transformadas fue logrado a través de un apropiado estímulo hormonal. Callos embriogénicos resistentes a la higromicina fueron seleccionados, transferidos a un medio de pre-regeneración (PRM) y encubados dentro de platos de Petri de altura de borde a 28°C por una semana. Los callos fueron luego transferidos a un medio de regeneración (RM) en el número de 8-10 por plato de Petri. La regeneración de planta ocurrió a 28°C por 3-4 semanas en la luz. Cuando las plantas estuvieron lo suficientemente de desarrolladas para ser separadas de los callos (≥ 3 cm en altura), se transfirieron en tubos de cultivo

conteniendo 25 mL de medio de enraizamiento (ROT). Tubos se mantuvieron por cerca de tres semanas a 28°C en la luz. Al final de proceso de regeneración, las plantas fueron sembradas en macetas en turba y crecieron hasta adultas en un fitotron confinado a 24°C, 85% de humedad relativa, bajo lámparas halógenas metálicas Osram Powerstar® HQI® - BT 400 W/D (fotoperiodo 16h de luz/8h de oscuridad).

Ejemplo 3: extracción total de proteína de semillas de arroz transformado con construcción GCase

Semillas de arroz transgénico fueron primero descascaradas y blanqueadas con Satake TO-92 (Satake Coporation, Japan). Las semillas de arroz blanqueadas fueron entonces molidas y la harina resultante fue homogenizada en el buffer de extracción (50 mM de acetato de sodio, 350 mM NaCl, pH = 5.5), usando una relación entre el volumen de buffer (mL) y peso de la harina (g) igual a 10:1.5. Después de la incubación a 4°C por una hora, las muestras fueron centrifugadas a 14000xg por 45 minutos. Después de la recuperación de sobrenadantes, las bolas restantes fueron usadas para dos extracciones más con el mismo procedimiento. Extracciones de proteínas obtenidas de las semillas blanqueadas y los residuos de blanqueamiento fueron ambos analizados en SDS-PAGE (Figura 3A y 3B) y tranferencia de Western. Estos análisis demostraron que la mayoría del beta-glucosidasa ácida humana recombinante está contenida en semillas blanqueadas y que esta puede ser eficientemente recuperada con tres extracciones consecutivas.

Ejemplo 4: análisis de tranferencia de Western y electroforesis 2-D en extracciones totales de proteínas de semillas transformadas GCase

Extracciones de proteínas totales fueron separadas en SDS-PAGE (Laemli, 1970) usando un aparato Mini Protean II y un gel poliacrilamida al 10% con 0.75- mm de espesor. Antes de ser cargado, las muestras fueron desnaturalizadas a 100°C por 5 minutos, sin beta-mercaptoetanol. Después de SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas en membrana difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P^{sq} por Millipore) con un aparato Trans-Blot SD (BioRad) a 15V por 30 minutos. Muestras luego se hibridaron con un anticuerpo anti-GCase policlonal producido por inmunización de dos conejos con imiglucerasa comercial. Las siguientes condiciones de hibridación fueron aplicadas: incubación por una hora a temperatura de salón usando una dilución igual 1:1000 en solución de bloqueo (7.5% p/v leche descremada Oxoid en PBS). Después de lavados en 0.1 % v/v de PBS Tween, un anticuerpo secundario conjugado HRP anti-conejo (Sigma, dilución 1:10000) fue incubado por 1 hora a temperatura de salón. Entonces quimioluminiscencia fue desarrollada con ECL PlusTM (GE Healthcare).

Para determinar el peso molecular de las bandas de proteínas positivas, el estándar del Precision Plus Protein (BioRad) fue usado junto con el anticuerpo de Precision Strepactin conjugado de HRP (BioRad) (Figura 4A).

Dos muestras conteniendo cerca de 20 µg de proteína total de semilla fueron analizadas por isoelectroenfoque y SDS-PAGE. El primer análisis fue ejecutado con el sistema de enfoque PROTEAN IEF (BioRad) y ReadyStrip IPG de 7cm, con un rango pH no lineal de 3-10 (BioRad).

Los extractos de proteína fueron precipitados con el Kit 2D Clean-Up (GE Healthcare) y suspendidos con 130 µL de solución DeStreak Rehydration (GE Healthcare) y 0.6 % de biolitos (Byolites) anfolitos 3-10 (BioRad). Las siguientes condiciones de ejecución se aplicaron:

Paso 1: 250 V por 15 minutos

Paso 2: 4000 V por 2 horas

Paso 3: 20000 V-hora por aproximadamente 24 horas.

Al final del proceso, tiras se lavaron con dos diferentes buffers de equilibrio: buffer de equilibrio I (2% DDT, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glicerol y 0.002% azul de bromofenol, pH= 8.8) por 15 minutos y buffer de equilibrio II (2.5% yodoacetamida, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glicerol y 0.002% azul de bromofenol, pH= 8.8) por 20 minutos.

Muestras fueron ejecutadas en una segunda dimensión en dos geles separados de acuerdo con un estándar de protocolo SDS-PAGE. Un gel electroforético fue manchado con Colloidal Coomassie Blue (Azul de Coomassie coloidal) (0.08% azul de coomassie R-250, 1.6% ácido orto-fosfórico, 8% sulfato de amonio, 20% metanol), mientras el otro fue analizado por transferencia de Western (Figura 4B). El procedimiento completo fue ejecutado en paralelo también para muestras de proteínas obtenidas de semillas CR W3 no transformadas.

Ejemplo 5: determinación del sitio de almacenamiento GCase por inmunolocalización

Semillas transformadas en la fase lechosa final fueron cosechadas, descascaradas, cortadas en fragmentos de 1 mm y fijadas en 0.2 % de glutaraldehído por una hora a temperatura de salón. Después de un lavado en 0.15 M en buffer de fosfato, una deshidratación con un gradiente de etanol

absoluto (desde 24 hasta 100%) fue ejecutada. Las muestras deshidratadas fueron embebidas en Withe Resin LR (Resina Blanca) (London Resin Co.) y finalmente polimerizadas a 60°C por 24 horas. Secciones (2-3 μm de espesor) fueron cortadas con un micrótopo Nova LKB (Reichert), colocadas en rejillas de malla de níquel (Electron Microscopy Science), incubadas por 15 minutos con una solución de suero normal de cabra (Aurion), diluida 1:30 en buffer C (0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2 % BSA) y eventualmente hibridadas por una hora a temperatura de salón con el anticuerpo primario anti-GCase diluido 1:500 en buffer C.

Después de varios lavados en buffer B (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl) con 0.1 % Tween 20 w/v (6 x 5 minutos), secciones fueron incubadas por una hora a temperatura de salón con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal (15 nm, Aurion) diluido 1:40 en buffer E (0.02 M Tris-HCl, pH 8.2 que contiene 0.9% NaCl y 1% BSA). La final de la hibridación, secciones fueron lavadas y manchadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963) y finalmente observadas con microscopio de electrón de transmisión Philips CM 10 (TEM).

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de GCase solamente en vacuolas de almacenamiento de proteína (PSVs) de endospermo de semilla; el anticuerpo policlonal anti-GCase permitió identificar GCase con una señal fuerte y clara, en la ausencia de fondo significativo. Los mismos análisis llevados a cabo en granos de arroz no transformados confirmaron la alta especificidad del anticuerpo anti-GCase por la escasez de alguna evidencia de sitios de reacción cruzada asociados a matriz (Figuras 5A y 5B).

Ejemplo 6: purificación de beta-glucosidasa acida humana recombinante de semilla de arroz

Para el propósito de purificación, un protocolo industrialmente escalable fue desarrollado; el protocolo es basado en el primer paso de captura obtenido con cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Figura 6A); un paso intermedio basado en cromatografía de intercambio de ion (IEC) (Figura 6B); un paso de final de pulido llevado a cabo con filtración de gel. Todos los pasos de cromatografía fueron ejecutados con el sistema Prime AKTA (GE Healthcare).

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

Este paso fue ejecutado con un Octilo FF HiTrap de 5 mL (GE Healthcare). Al principio del procedimiento, la columna fue equilibrada con un volumen de buffer de carga (50 mM de acetato de sodio, 350 mM de NaCl y 100 mM de sulfato de amonio, pH = 5.5); antes de la carga de muestras, una solución de 3 M de sulfato de amonio fue agregada a un extracto clarificado para conseguir la concentración final de 100 mM de sulfato de amonio y entonces el extracto fue filtrado a través de un filtro de 0.2 mm (Millipore).

La muestra fue aplicada a la columna a una relación de flujo de 1mL/min. La columna fue lavada con tres volúmenes de carga de buffer y con 50 mM de acetato de sodio, pH 5.5 hasta una línea de base plana. Elución fue llevada a cabo con 66% de glicol etileno en 50 mM de acetato de sodio. Al final del procedimiento, la columna fue lavada y regenerada con 20% de etanol.

Cromatografía de intercambio de ion (IEC)

Para IEC, un HiTrap SP FF de 5 mL (GE Healthcare) que contiene una resina catiónica fue usado. La columna fue equilibrada con 50 mM de acetato de sodio (Soln. A); luego, la fracción eluida HIC, diluida 1:1 con el mismo buffer, fue cargada. Después del lavado de columna, una elución de gradiente discontinua fue ejecutada usando cantidades de incremento de NaCl igual a 15, 20 y 100% de una solución 1M en soln.

Al final, la columna fue regenerada con 20% de etanol. Ensayos inmunológicos llevados a cabo en alícuotas recolectadas de cada operación cromatografica demostraron que beta-glucosidasa acida humana recombinante es eluida con la solución que contiene 20% de NaCl. Pruebas de actividad enzimática ejecutadas en fracciones eluidas obtenidas de extractos de proteínas de semillas nos transformadas mostraron que la separación de beta-glucosidasa acida humana de componentes endógenos responsables de una actividad como GCase ocurre en el paso cromatografico. En particular, se restableció que a una concentración de 20% de NaCl el componente endógeno es eficientemente retenido en la columna (Figura 7).

Filtración de gel

Para la filtración de gel, una columna de alta resolución HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 (GE Healthcare) y un buffer de elución compuesto de 20 mM de acetato de sodio y 200 mM de NaCl, pH 5.5 fueron usados. La columna fue inicialmente lavada con dos volúmenes del buffer, luego el producto eluido IEC fue cargado a una relación de flujo de 0.3 mL/min. El pico de interés fue analizado por SDS-PAGE y transferencia de Western (Figuras 8A y 8B).

Ejemplo 7: determinación de actividad enzimática GCCase

La actividad de GCCase humano recombinante fue ensayada usando 4-MUG (4-metilumbelliferil β -D-glucósido, Sigma) como sustrato. La mezcla de reacción contenía 75 mM de buffer de fosfato de potasio pH 5.9, 0.125% w/v taurocolato y 3 mM 4-MUG. La reacción fue llevada a cabo a 37°C por una hora, usando 10 μ L de muestra en 300 μ L de solución de ensayo. La reacción fue parada adicionando 1690 μ L de 0.1 M glicina-NaOH, pH 10.0. La actividad enzimática fue medida con un fluorímetro en una longitud de onda de excitación de 365 ± 7 nm y una longitud de onda de emisión igual a 460 ± 15 nm. Una unidad (U) fue definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de sustrato por minuto. Cantidades de muestra diferentes se probaron en comparación con cantidades conocidas de imiglucerasa comercial.

El ensayo fluorométrico demostró que GCCase humana recombinante producida en endospermo de arroz es activa y caracterizada por la misma reacción cinética de imiglucerasa comercial.

Ejemplo 8: determinación de la secuencia N-terminal de GCCase recombinante

La corrección de la secuencia N-terminal de GCCase fue establecida por microsecuenciamiento de proteína. Para este propósito, una alícuota de enzima fue purificada con HIC y IEC, cargada en un gel SDS-poliacrilamida y, al final de la electroforesis, transferida a una membrana PVDF usando el aparato Trans-Blot Semi-Dry (condiciones de transferencia: 25 V para 30 minutos en 10 mM buffer CAPS y 10% metanol, pH 11.0).

Después de la transferencia, la membrana fue manchada con 0.25% (w/v) de la solución Coomassie-Blue R-250 en 50% metanol por 5 minutos, lavada con agua y desmanchada con una solución 50% etanol por 10 minutos para visualizar la banda correspondiente a la proteína de interés. Microsecuenciamiento se llevo a cabo de acuerdo con el procedimiento de degradación de Edman (Edman, 1950).

El análisis mostro la presencia de un nonapéptido (ARPCIPKSF) perfectamente superponiendo con la secuencia N-terminal de la forma adulta de beta-glicosidasa acida humana. Por lo tanto, se puede concluir que el péptido señal de glutelina 4 de arroz es bien reconocido por el sistema de membrana ER y correctamente removido durante el proceso de internalización.

Ejemplo 9: análisis MALDI-TOF en GCase purificada

Digestión de proteína con tripsina

Después de electroforesis de gel y tinción con 0.25% (w/v) de solución de agua Coomassie-Blue R-250, 50% metanol, 10% ácido acético glacial, la banda de proteína correspondiente a GCase recombinante fue cortada y lavada a 37°C con 300 µL de 100 mM NH_4HCO_3 y 100% solución acetonitrilo (ACN) (50:50 v/v), machacada y deshidratada con mas 100 µL de ACN.

La banda de proteína fue subsecuentemente tratada con 50 µL de 20 mM DTT en 100 mM NH_4HCO_3 a 56°C por una hora para obtener una reducción de puentes de disulfuro y alquilados con 50 µL de 50 mM IAA (yodoacetamida) en 100 mM NH_4HCO_3 por 30 minutos. Además, la banda de proteína fue lavada con 300 µL

de 100 mM NH_4HCO_3 , luego con 300 μL de 20 mM NH_4HCO_3 y 100% solución ACN (50:50 v/v) y deshidratada de nuevo con la adición de 100 μL ACN. Finalmente, la banda de proteína fue rehidratada con 5-10 μL de buffer de digestión que contiene 100 mM NH_4HCO_3 y 50 ng/ μL tripsina (Promega); después de 30 minutos, 20 μL de 20 mM NH_4HCO_3 fueron agregados. Después de la incubación de la muestra a 37°C de un día para otro, el buffer que contiene péptidos tríticos fueron removidos y una extracción péptica adicional realizada agregando 10 μL de 2% de ácido fórmico y 60% solución ACN (50:50 v/v) a la muestra.

Las dos extracciones fueron agrupadas y usadas para análisis MALDI-TOF (Perkin Elmer).

Purificación péptica por resina C18

El digesto trípico fue purificado y desalado con un zip-tip C18 (Millipore). Puntas fueron lavadas cuatro veces con 10 μL de 100% ACN y tres veces con 10 μL de 0.1 % TFA (ácido trifluoroacético). La muestra fue entonces agregada a las muestras activadas; después de baños con 0.1 % TFA, los péptidos ligados a la resina de fase inversa de zip-tip C18 fueron eluidos con 10 μL de 100% ACN y 0.1% TFA a un ratio 70:30 (v/v).

Identificación de proteína por impresión dactilar de masa de péptido en espectrometría de masa MALDI-TOF

Preparación de muestra para análisis MALDI-TOF fue ejecutada agregando 1 μL de resina CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) solución concentrada colocada en un soporte metálico para 1 μL de péptidos purificados. Los análisis (Figura 9)

demostraron que la proteína purificada con el procedimiento descrito en el ejemplo 6 seguramente corresponde al beta-glucosidasa acido humano. En particular, su identificación fue obtenida con un puntaje de 10^{-32} y un cubrimiento de secuencia con reconocidos péptidos igual a 53%.

Estos resultados son de garantía absoluta, considerando que el nivel de significancia es alcanzado con un puntaje $\geq 10^{-6}$ y un porcentaje de cubrimiento $\geq 30\%$. De manera interesante, ambos, el N-termino y el C-termino de la proteína fueron encontrados entre los péptidos reconocidos en MALDI-TOF (ver tabla 1 para la lista completa).

Tabla 1: asignaciones principales de los péptidos tripticos analizados por espectrometría de masa de MALDI-TOF.

Mteorical	ΔM	Asignacion
840.464	-0.010	1-7 N-terminus
883.451	+0.104	322-329
932.472	+0.122	426-433
950.461	+0.102	347-353
976.586	+0.073	286-293
988.655	+0.045	156-163
1002.517	+0.084	278-285
1086.628	+0.209	464-473
1281.585	+0.008	121-131
1459.792	-0.023	396-408
1527.722	+0.006	199-211
1630.818	+0.995	263-277

1646.794	+0.018	107-120
1664.806	+0.038	347-359
1714.937	-0.087	426-441
1870.896	+0.120	330-346
2099.099	+0.170	304-321
2304.190	+0.074	442-463
2562.432	+0.205	164-186
2846.256	+1.025	132-155
3087.435	+1.005	132-157
3139.530	+0.325	199-224
3217.641	+1.521	258-285
3424.784	+1.007	506-535 C-terminus

Ejemplo 10: producción del vector de expresión GAA

Este ejemplo describe un método para la expresión específica de endospermo de alfa-glucosidasa acida humana en arroz. En particular, la realización del ventor de expresión final pSV2006[GluB4pro/LLTCK/GAA/NOster] esta reportado. Este vector fue realizado por reemplazo del gen GCase con el gen GAA en el previamente mencionado vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOster].

La secuencia codificante de alfa-glucosidasa acida humana (GenBank Acc. No. NM_00152) fue modificada con la idea de incrementar los niveles de expresión transgén en endospermo de arroz; la nueva secuencia codificante GAA fue reescrita sobre la base de uso de codón de arroz. Más aún, se decidió reemplazar

el péptido señal nativa GAA con PSGLuB4, precisamente el mismo péptido de tránsito usado para apuntar GCase recombinante en el lumen ER.

Desde que secuencia codificante GAA es 2850 bp de longitud, este fue artificialmente sintetizado en tres fragmentos (A, B y C). Para ensamblar estos fragmentos en un modo orientado claramente, sitios de restricción de enzima específicos fueron introducidos por mutación puntual de sinónimo en sus bordes. Un sitio *Xba* I y *Sac* I fue introducido respectivamente en el extremo 5' del primer fragmento y en el extremo 3' del tercer fragmento para facilitar la clonación del gen GAA entero en pSV2006.

El ensamble de los tres fragmentos GAA fue ejecutado en el vector pUC18 (Figura 10); después de haber chequeado su secuencia completa (SEQ ID No: 9), el gen fue extirpado de pUC18 por digestión con *Xba* I y *Sac* I y clonado en substitución del gen GCase dentro de pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGLuB4/GCase/NOSter], para dar el vector de expresión final pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGLuB4/GAA/NOSter] (Figura 1).

Ejemplo 11: transferencia de Western en extractor proteínicos GAA

Cinco semillas descascaradas fueron molidas con 1mL de 350 mM de NaCl en buffer de 50 mM de fosfato de sodio (pH = 6.2) usando mortero y brazo de mortero. El homogeneizado resultante fue incubado en hielo por 1 hora bajo agitación y luego centrifugado a 15000xg por 45 minutos a 4°C. El sobrenadante (20 µg proteína soluble) fue cargado en un 10% de gel poliacrilamida junto con Precision Protein Standard (Estándar de proteína de precisión) (BioRad).

El gel fue electrotransferido a una membrana de 0.2 μ m PVDF (Millipore) con el aparato Trans-blot SD (BioRad). La transferencia (blot: transferencia por adsorción) fue bloqueada con 7.5% de leche seca no grasosa en buffer PBS (Oxoid) por una hora a temperatura de salón. Después del lavado, el anticuerpo policlonal de conejo primario, producido usando alfa alglucosidasa liofilizada (MyozymeTM, Genzyme Corp.) como antígeno, fue diluida 1:5000 en el buffer de bloqueo y la transferencia fue incubada por una hora a temperatura de salón. Luego, el antibiótico secundario conjugado HRP (Sigma Aldrich) fue diluido 1:10000 y la membrana incubada por una hora a temperatura de salón. Después de los lavados finales, quimioluminiscencia fue desarrollada con ECL plus (GE Healthcare Bio-Sciences) (Figura 12).

Ejemplo 12: Inmunolocalización de GAA recombinante de endospermo de arroz

El procedimiento fue bastante similar al descrito para semillas de arroz transformadas con la construcción GCase.

Brevemente, aproximadamente 10-15 días después de la floración, semillas de arroz no maduras aún fueron deshidratadas y embebidas en Resina Blanca LR (London Resin Co. Ltd., Hamshire, UK). Bloques fueron polimerizados a 60°C por 24 horas. Secciones ultra delgadas fueron cortadas con el Nova LKB ultramicrotomo (Reichter) y montadas en rejillas de níquel (Eletron Microscopy Sciences) para inmunolocalización.

Secciones fueron incubadas con Antisuero Normal de Cabra (Aurion) diluido 1:30 en buffer C por 15 minutos y entonces con el suero anti-GAA (el mismo usado

para análisis de transferencia de Western) diluido 1:100 en buffer C por 1.5 horas a temperatura de salón. Después del lavado, las secciones fueron incubadas por una hora con una solución de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugada con 15 nm de oro coloidal (Aurion) diluido 1:40 en 0.02 de M Tris-HCl pH 8.2 que contiene 0.9% de NaCl y 1% de BSA.

Secciones fueron manchadas con 0.1% de citrato de plomo (Reynolds, 1963) y examinadas con un microscopio de electrón de transmisión Philips CM10 (TEM). El mismo procedimiento se llevo a cabo en una muestra derivada de arroz no transformado.

Como se observo en las secciones de semillas GCase, el etiquetado inmuno-oro de endospermo de semilla GAA mostro que la enzima recombinante esta específicamente localizada dentro de vacuolas de almacenamiento de proteínas (PSVs) (Figura 13). No se detectaron señales en cuerpos de proteínas (PBs) o en el control negativo CR W3.

Ejemplo 13: ELISA en extractos de proteína GAA

Antes de ejecución de ELISA, 2 ml del anticuerpo antisuero anti-GAA, producido en conejos como se mencionó en el ejemplo 11, fueron purificados por una columna Hitrap rProtein A FF de 1 mL (GE Healthcare). Luego los IgGs purificados fueron conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) usando el kit de peroxidasa de rábano EZ-Link[®] Maleimida activado (Pierce) como se reporto en el siguiente protocolo: 100 µL de buffer de conjugación Maleimida fueron agregados a la ampolla 6-mg de 2-MEA; la solución fue agregada a la muestra IgG y la mezcla incubada por 90 minutos a 37°C. Desde del equilibrio a temperatura de salón, la solución IgG/2-MEA fue aplicada a una columna de desalación, pre-

equilibrada con 30 mL de buffer de conjugación de Maleimida. Subsecuentemente, buffer de conjugación de Maleimida fue agregado a la columna y fracciones de 0.5 mL fueron recolectadas.

Para localizar el pico de proteína, la absorbancia de cada fracción fue leída a 280 nm; las fracciones que contienen la IgG reducida fueron agrupadas y agregadas a la ampolla de HRP activada. La reacción fue incubada por una hora a temperatura de salón. Finalmente, una filtración de gel usando una columna superdex 200 10/300 GL en buffer de recubrimiento de Maleimida (que contiene PBS y EDTA) fue ejecutada.

El pico eluido fue concentrado por Amicon Ultra-10 (Millipore) hasta una concentración de 0.85 µg/µL. La calidad del anticuerpo anti-GAA conjugado de HRP fue probado por ELISA. Para este propósito, 1 mg/mL de Miozime de antígeno fue recubierto en un plato; después del bloqueo, el conjugado fue agregado en diluciones diferentes e incubado a 37°C por 30 minutos.

La detección fue realizada usando substrato TMB (3, 3', 5, 5''-tetrametilbenzidina); el límite de detección más bajo del antígeno fue obtenido con una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-GAA conjugado HRP.

Este anticuerpo fue luego utilizado para ejecutar un sánduche ELISA en extractos de proteína cruda como se describe abajo.

El recubrimiento fue ejecutado agregando 100 µL de 15 ng/µL de anticuerpo anti-GAA purificado en micropocillos del plato ELISA e incubando a 4°C de un día para otro.

Después del bloqueo con 3% BSA en PBS por una hora a temperatura de salón y un enjuague con PBS 0.1% Tween-20, extractos de semilla total de proteína (diluido 1:10 o 1:100 en PBS, 0.1% Tween-20 y 1% BSA) fueron agregados e incubados por 30 minutos a 37°C. Al final de la incubación, tres lavados se hicieron y luego el anticuerpo anti-GAA conjugado de HRP fue añadido a la dilución de 1:40 en PBS, 0.1% Tween-20 y 1% BSA e incubado por 30 minutos a 37°C. Después de cuatro lavados, la detección fue realizada usando substrato TMB.

Sobre la base de pruebas ELISA llevadas a cabo con cantidades conocidas de Miozime estándar, muestras de proteínas de semillas obtenidas de transformantes primarios GAA mostrados en contenido GAA promedio igual a 0.5% de proteínas solubles total.

Es claro que modificaciones y/o adiciones de partes o pasos pueden ser hechas al método para la producción de las enzimas lisosomales humanas recombinantes en un endospermo cereal como se describió hasta ahora, sin partir desde el alcance de la presente invención.

También es claro que, aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a algunos ejemplos específicos, una persona experta en el tema ciertamente estará en capacidad de lograr muchas otras formas equivalentes del método para la producción de las enzimas lisosomales humanas recombinantes en un endospermo cereal que tiene las características según lo dispuesto en las solicitudes y por lo tanto todo está dentro del campo de protección definido de tal modo.

RESUMEN

Un método para la producción de una proteína humana en una planta, en particular de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de una planta de cereal, que comprende:

- un primer paso de transformación de la planta de cereal en donde la enzima lisosomal de proteína es obtenida y confinada en un endospermo, que eventualmente no es absorbido por el embrión, y la presencia de grandes cantidades de la enzima lisosomal de proteína en el endospermo no afecta de forma negativa la viabilidad de las semillas y la velocidad de germinación;
- el uso, en el primer paso de la transformación de la planta de cereal, de un promotor específico de endospermo corriente arriba del gen que codifica dicha enzima lisosomal de proteína, y de un péptido de señal para una transferencia co-traslacional de la enzima lisosomal de proteína recientemente sintetizada dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo para su acumulación específica a tejidos;
- un segundo paso de acumulación de la enzima lisosomal dentro del endospermo de la semilla de una planta de cereal.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, apropiadas para uso terapéutico, en un endospermo de cereal, , caracterizado en que comprende:

- the construction of a plant expression vector for the transformation of such cereal, containing a nucleotide sequence harbouring the following elements:

i) the rice glutelin 4 promoter (GluB4pro) as an endosperm-specific promoter upstream the gene encoding said lysosomal enzyme;

ii) the leader known as LLTCK as a 5' UTR region;

iii) the PSGluB4 sequence encoding a signal peptide used in rice to target the precursor of glutelin 4 inside the endoplasmic reticulum, said signal peptide being suitable to carry out a co-translational transfer of the newly synthesized lysosomal enzyme into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells and to determine the accumulation of said lysosomal enzyme in a specific cell compartment;

iv) a nucleotide sequence encoding the mature form of the human lysosomal enzyme;

v) a 3' UTR of natural or artificial origin;

- a step of cereal plant transformation using said vector, whereby the lysosomal enzyme is obtained and confined in an endosperm, which is not eventually absorbed by the embryo, and the presence of large quantities of the lysosomal enzyme in the endosperm does not negatively affect seed viability and germination speed;

- a step of lysosomal enzyme accumulation inside the seed endosperm of said cereal plant.

2. Método como en la reivindicación 1, caracterizado por la acumulación de enzima lisosomal dentro de vacuolas de almacenamiento de proteínas de endospermo (PSVs) o cuerpos de proteína (PBs).

3. Método con en la reivindicación 1 o 2, caracterizado en que la secuencia de nucleótido del vector de expresión es como se indica en la SEQ ID No: 1.

4. Método como en la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado en que el vector de expresión es introducido en cepas bacteriales, que son, directa o indirectamente, utilizadas para la transformación de plantas.

5. Método como en la reivindicación 4, caracterizado en que la cepa bacterial elegida pertenece a un grupo que comprende *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.

6. Método como en la reivindicación 4 o 5, caracterizado en que la cepa bacterial es utilizada para la transformación de las células embriogénicas del arroz (*Oryza sativa* ssp. Japonica, variedad CR W3).

7. Método como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado en que la enzima lisosomal es la beta-glucosidasa ácida humana.
8. Método como en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado en que la enzima lisosomal es la alfa-glucosidasa ácida humana.
9. Método como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado en que este comprende un paso de manufactura industrial de semillas de cereal.
10. Método como en la reivindicación 9, caracterizado en que el proceso de fabricación industrial somete las semillas maduras recolectadas de la plantas de cereal transformado para operaciones de descascarado y blanqueado para eliminar el componente fibroso, el germen y la capa aleurónica que contiene contaminantes de proteínas.
11. Método como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por un paso de purificación del de la enzima lisosomal recombinante, el cual incluye una cromatografía de interacción hidrofóbica, una cromatografía de intercambio de iones y una filtración de gel.
12. Método como en la reivindicación 11, caracterizado en que el paso de purificación incluye la aplicación de resinas cromatográficas que tienen similar composiciones químicas y/o estructura y/o funciones, la modificación parcial de condiciones de elución, la duplicación de un conducto.

13. Secuencia de nucleótido apropiada en la transformación de planta de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, apropiada para uso terapéutico, in un endospermo de cereal, caracterizado en que este incluye los siguientes elementos:

- i) el promotor de glutelina de arroz 4 (GluB4pro) como un promotor específico de endospermo; corriente arriba del gen codificador de dicha enzima lisosomal;
- ii) el líder conocido como LLTCK como una región 5' UTR;
- iii) la secuencia PSGluB4 codificando un péptido de señal utilizado en el arroz para dirigirse hacia el precursor de la glutelina 4 dentro del retículo endoplásmico, dicho péptido de señal siendo apropiado para llevar a cabo una co-traslacional de la enzima lisosomal recientemente sintetizada dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y para determinar la acumulación de dicha enzima lisosomal en un compartimiento de célula específico;
- iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la enzima lisosomal humana;
- v) un UTR 3' de origen natural o artificial.

14. Secuencia como en la reivindicación 13, caracterizada en que la secuencia de nucleótido del elemento iv) es la secuencia que codifica la forma madura de la beta-glucosidasa ácida humana o la secuencia que codifica la forma madura de la alfa-glucosidasa ácida humana.

15. Secuencia como en la reivindicación 13 o 14, caracterizada en que la 3' UTR del elemento v) es el terminador NOS del gen Glu B4.

16. Secuencia de nucleótido como en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 15, como se indica en la SEQ ID No: 1.

17. Secuencia complementaria a las secuencias de nucleótido como en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 16 o que se derive de eventos de mutación, como supresiones, inserciones, sustituciones de uno o más nucleótidos en secuencias como en cualquiera de las reivindicaciones desde la 13 a o sus secuencias complementarias.

18. Vector molecular para la expresión de enzimas lisosomales humanas recombinantes apropiadas para uso terapéutico, in un endospermo de cereal, que comprende la secuencia de nucleótido como en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 17.

19. Vector como en la reivindicación 18, caracterizado en que la enzima lisosomal es la beta-glucosidasa ácida humana o la alfa-glucosidasa ácida humana.

20. El uso del vector de expresión como en la reivindicación 18 o 19 para la transformación de un cereal para la producción de enzimas lisosomales humanas apropiadas para uso terapéutico.

21. Cepa bacterial que alberga vectores como en la reivindicación 18 o 19, escogida de un grupo que comprende las especies *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.

22. Células de plantas de cereal transformadas con un vector de expresión como en la reivindicación 18 o 19.

23. Células como en la reivindicación 22 pertenecientes a las especies de arroz cultivado (*Oryza sativa* L.).

24. Células como en la reivindicación 22 o 23 pertenecientes a la familia Graminaceae (Poaceae) como por ejemplo el maíz (*Zea mays* L.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.) y el trigo (*Triticum* spp.).

25. Semillas de la planta de cereal transformada para la expresión de enzimas lisosomales humanas apropiadas para el uso terapéutico, caracterizadas en que estas contienen un casete de expresión derivado de un vector como en la reivindicación 18 o 19.

26. Semillas como en la reivindicación 25, caracterizadas en que la planta de cereal transformada pertenece a las especies de arroz cultivado (*Oryza sativa* L.).

27. Planta de cereal transformada para la expresión de enzimas lisosomales humanas apropiadas para el uso terapéutico, caracterizada en que esta es transformada por un vector de expresión como en la reivindicación 18 o 19.

28. Planta de cereal transformada como en la reivindicación 27 perteneciente a las especies de arroz cultivado (*Oryza sativa* L.).

29. Progenies obtenidas por fertilización propia, cruces naturales o artificiales, o líneas transformadas seleccionadas de una planta transformada como en las reivindicaciones 27 o 28.

30. Semillas como en las reivindicaciones 25 o 26 para el uso en terapia de reemplazo de enzimas.

31. Semillas como en la reivindicación 30 para el uso en terapia de reemplazo de enzimas de las siguientes enfermedades: enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick B, Mucopolisacaridosis I, II, IV.

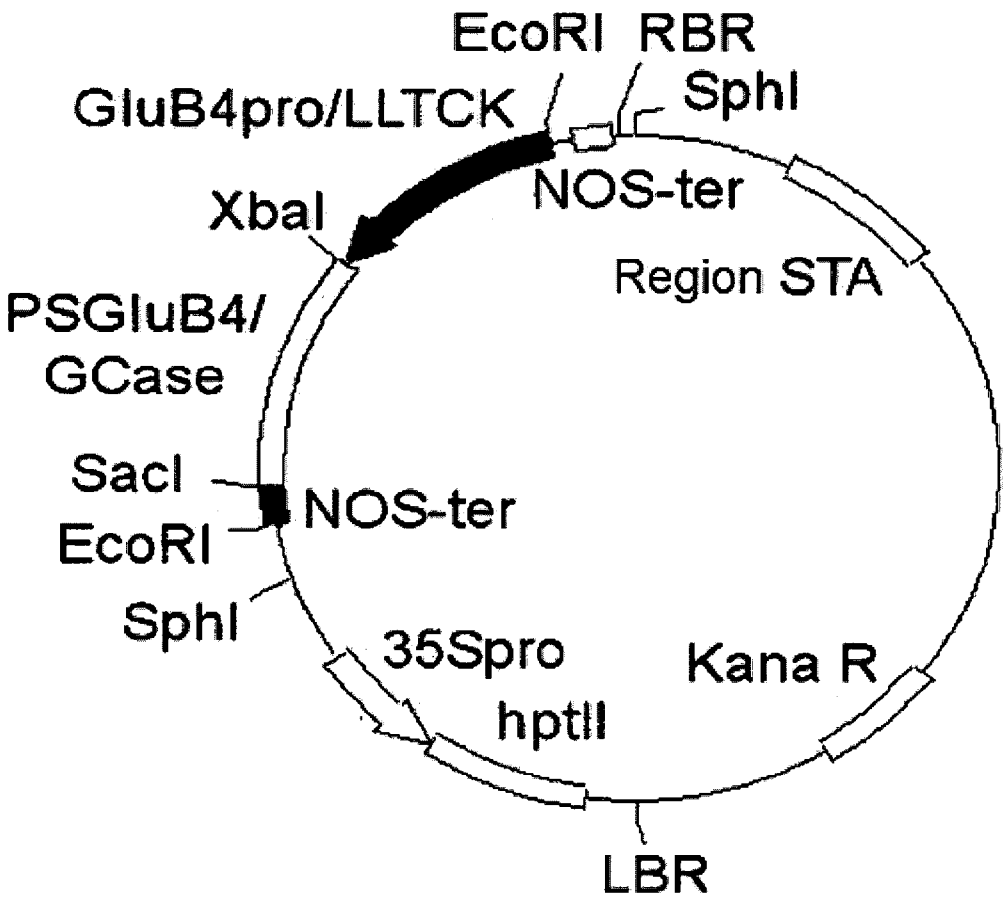


Figura 1

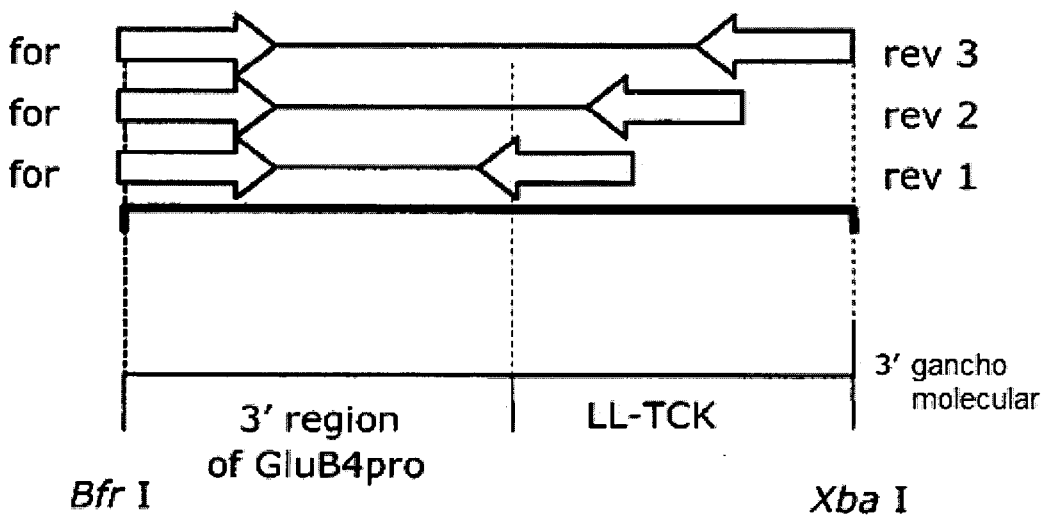


Figura 2^a

2/8

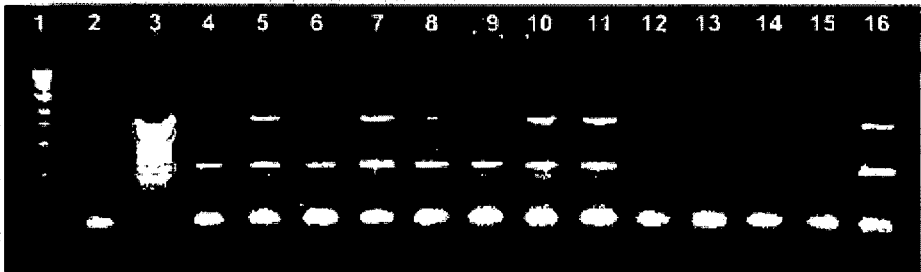


Figura 2B

A 1 2 3 4 5 6 7

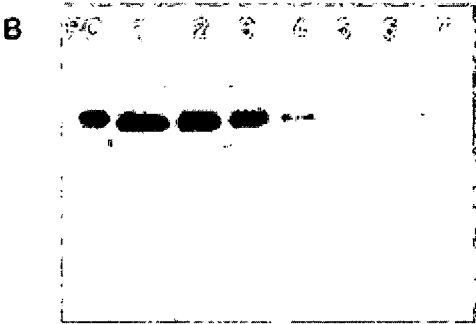


Figura 3A

Figura 3B

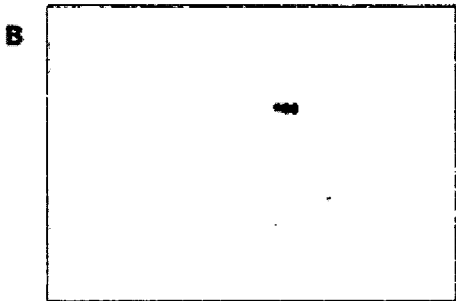
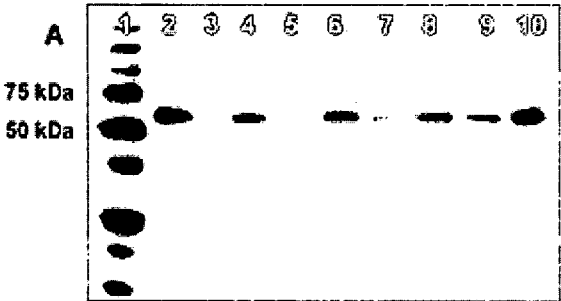


Figura 4A

Figura 4B

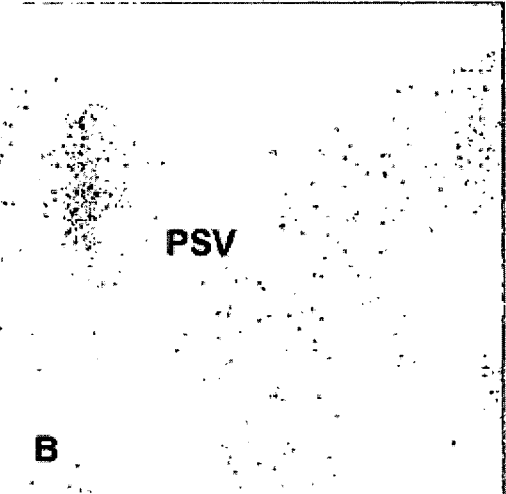
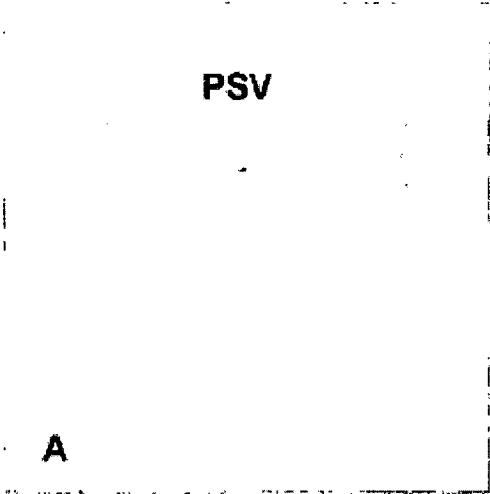


Figura 5A

Figura 5B

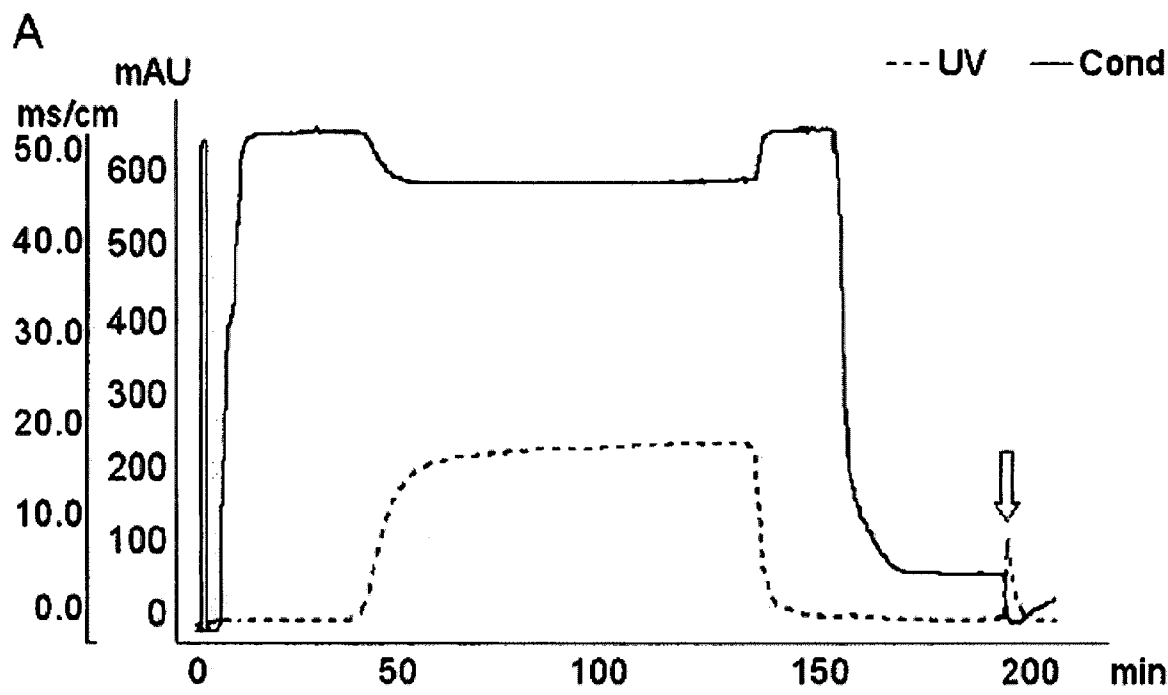


Figura 6A

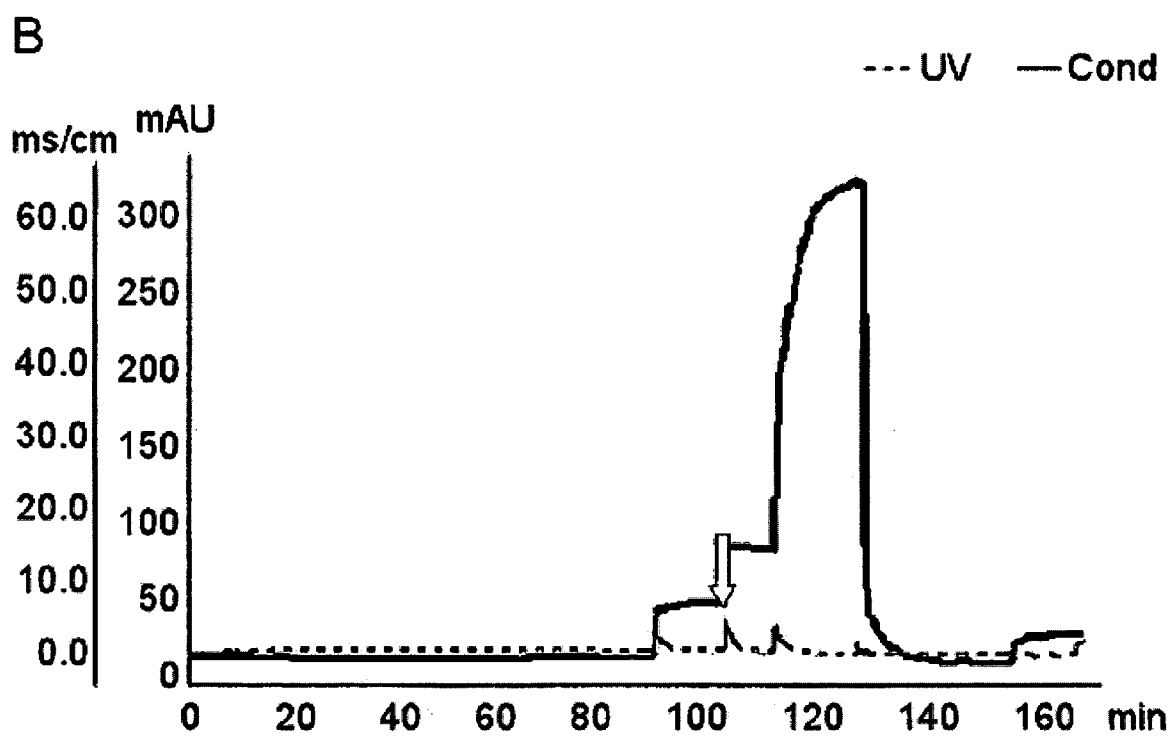
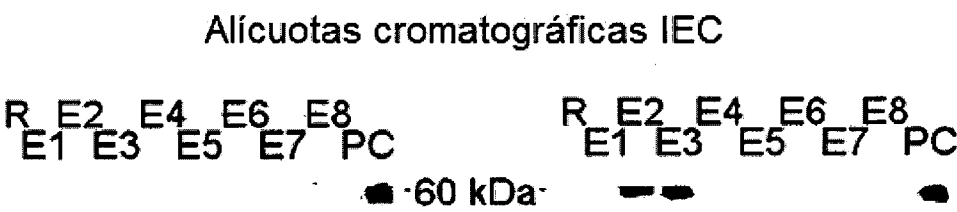
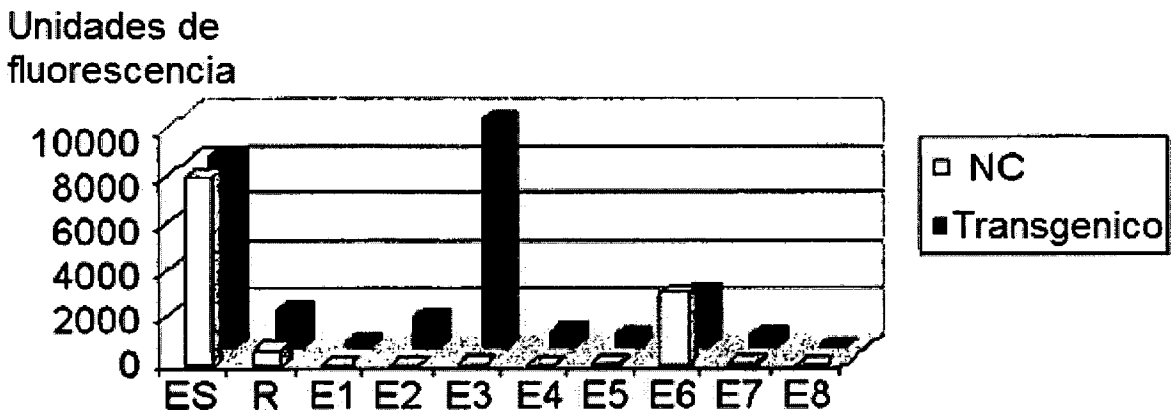


Figura 6B



NC Figura 7

Transgenico

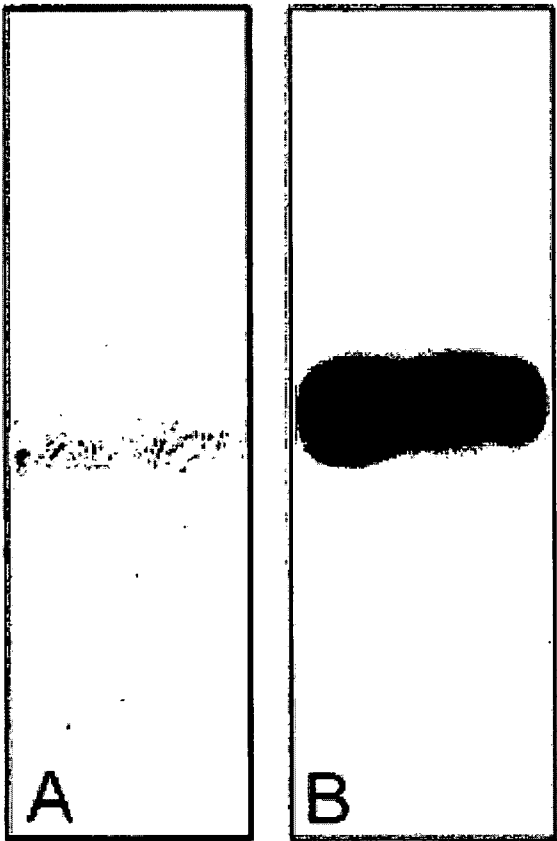


Figura 8A

Figura 8B

5/8

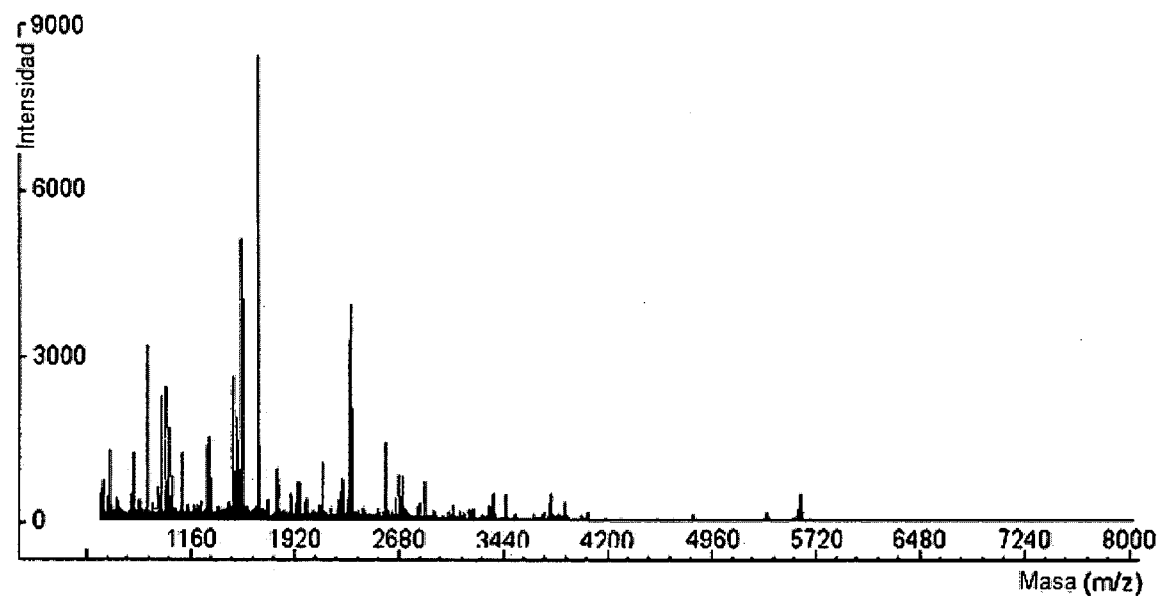


Figura 9

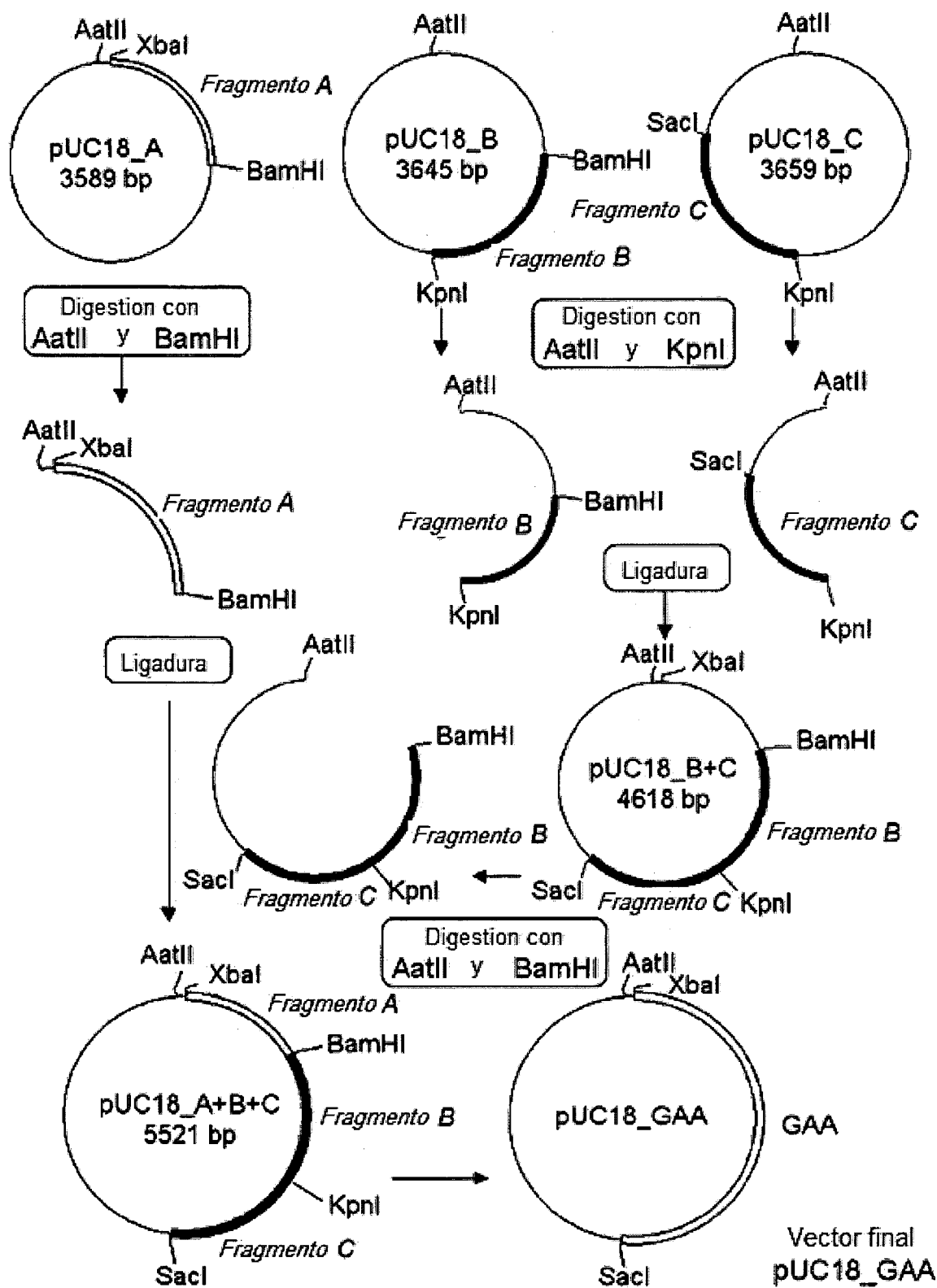


Figura 10

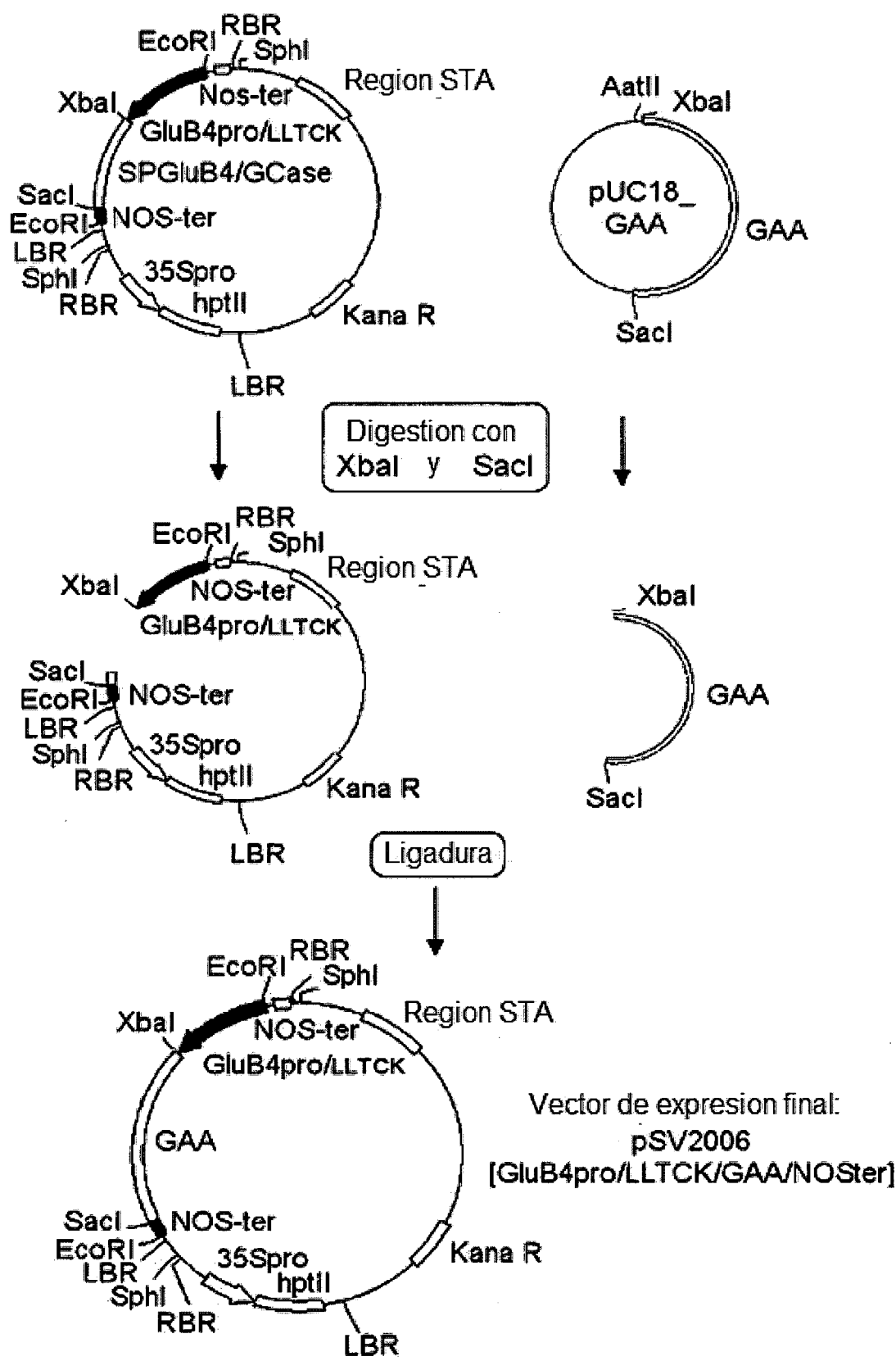


Figura 11

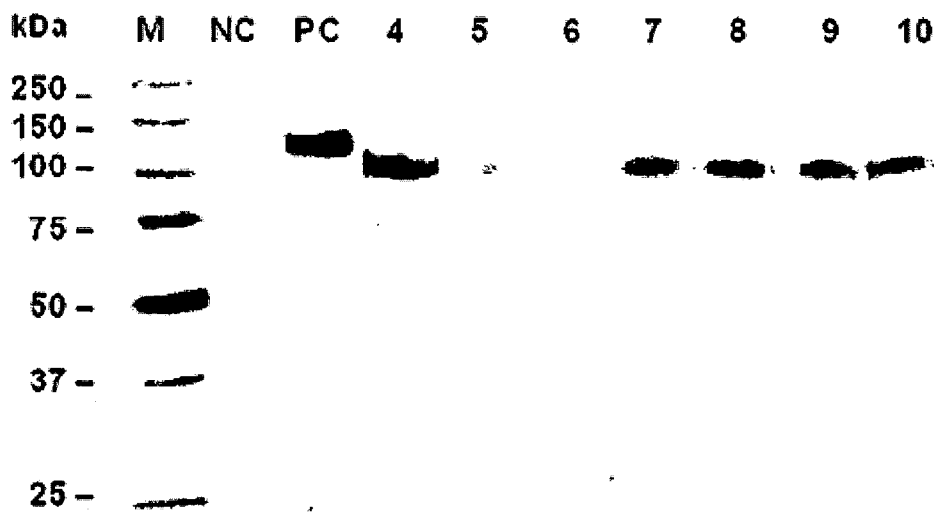


Figura 12

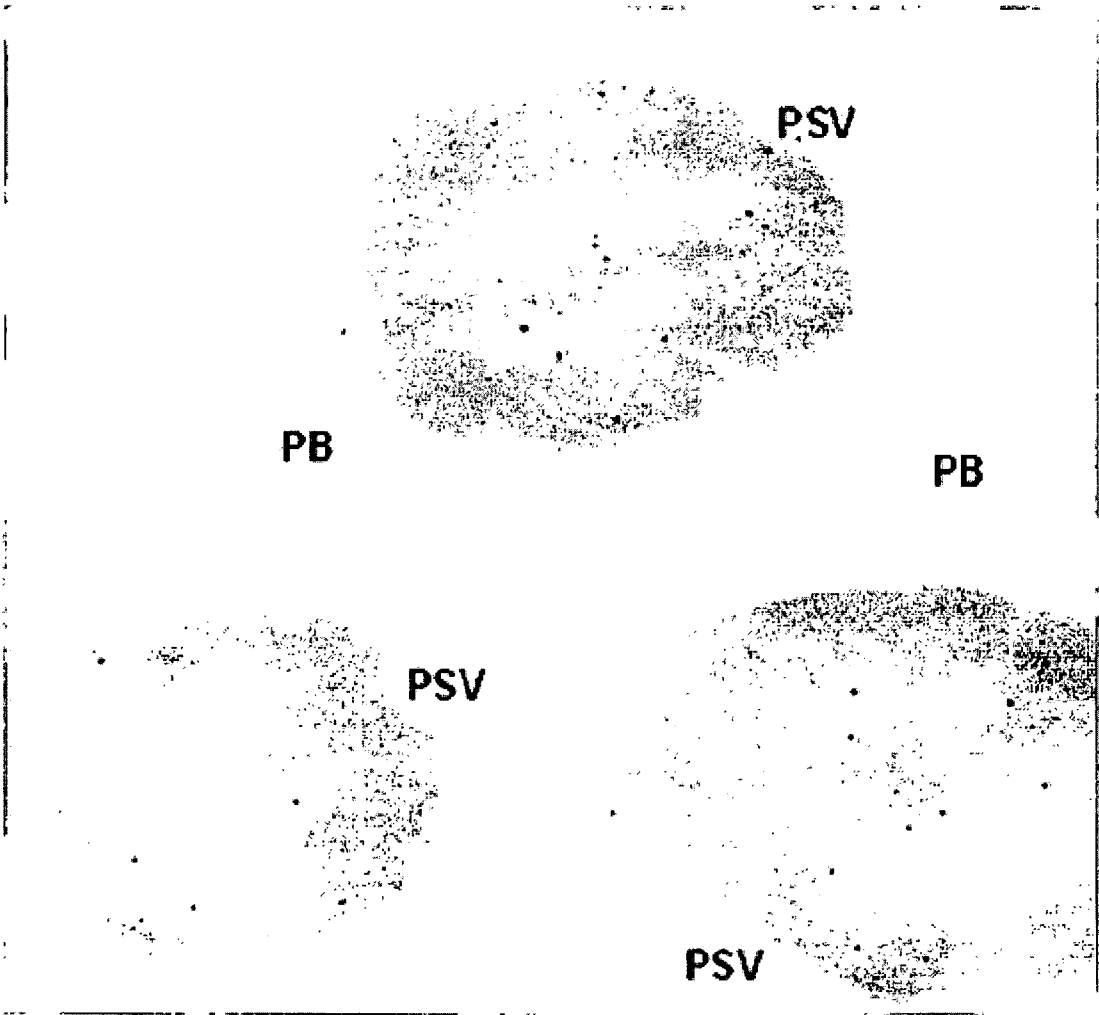


Figura 13

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 108,551
FECHA : DICIEMBRE 20 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	146326865	20/12/2010	54,481,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12	MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	114,000.00
	TOTAL :	\$ 114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17896-841-001-3

244

2020
Bogotá D.C.,

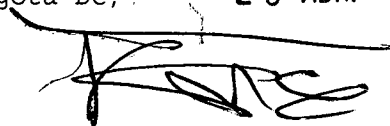
Doctor(a)
SUÁREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
TRANSACTIVA SRL

REFERENCIA	Radicación No.	10 125899
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/052832
	Fecha inicio fase nacional	13/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	13003
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

28 ABR. 2011


JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

jfernand