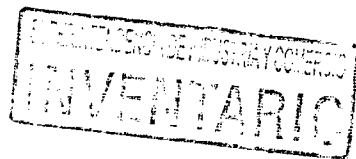




Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

JK

07



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-125899

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN PEOTEINA HUMANA EN UNA
PLANTA, EN PARTICULAR UNA ENZIMA LISOSOMAL RECOMBINANTE
HUMANA EN UN ENDOSPERMO DE CEREAL

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

TRANSACTIVA SRL

DOMICILIO

UDINE, ITALIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

(FORMA P-10)

Rodriguez
11-10-2010

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **TRANSACTIVA SRL**

Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Italia.

Dirección: Vía Jacopo Linussio, 51,
I-33100 Udine,
ItaliaDomicilio: Udine,
Italia**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

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

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Stefano MARCHETTI**Via dei Brazzà, 29,
I-33010 Pagnacco,
Italia3. **Tamara PATTI**Via Beorcje, 15,
I-33030 Buja
Italia2. **Bruno BEMBI**Via Guido Reni, 6,
I-34123 Trieste,
Italia4. **Piero CRISTIN**Via Garzarolli, 77,
I-34170 Gorizia,
Italia

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/052832Fecha: 11 de marzo de 2009Publicación Internacional No. WO 2009/112508 A1Fecha: 17 de septiembre de 2009

6

Título (54)**UN MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN PROTEÍNA HUMANA EN UNA
PLANTA, EN PARTICULAR UNA ENZIMA LISOSOMAL RECOMBINANTE HUMANA
EN UN ENDOSPERMO DE CEREAL**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 015/082

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

IT

(32) Fecha

13 de marzo de 2008

(31) Número de Solicitud

UD2008A000055

9

Comprobante de pago No.: 10-69,463
Comprobante de pago No.: 10-79,591
Comprobante de pago No.: 10-80,678
Comprobante de pago No.: 10-80,679
Comprobante de pago No.: 10-83,170
Comprobante de pago No.: 10-83,210

Fecha: 23 de agosto de 2010
Fecha: 23 de septiembre de 2010
Fecha: 27 de septiembre de 2010
Fecha: 27 de septiembre de 2010
Fecha: 05 de octubre de 2010
Fecha: 05 de octubre de 2010

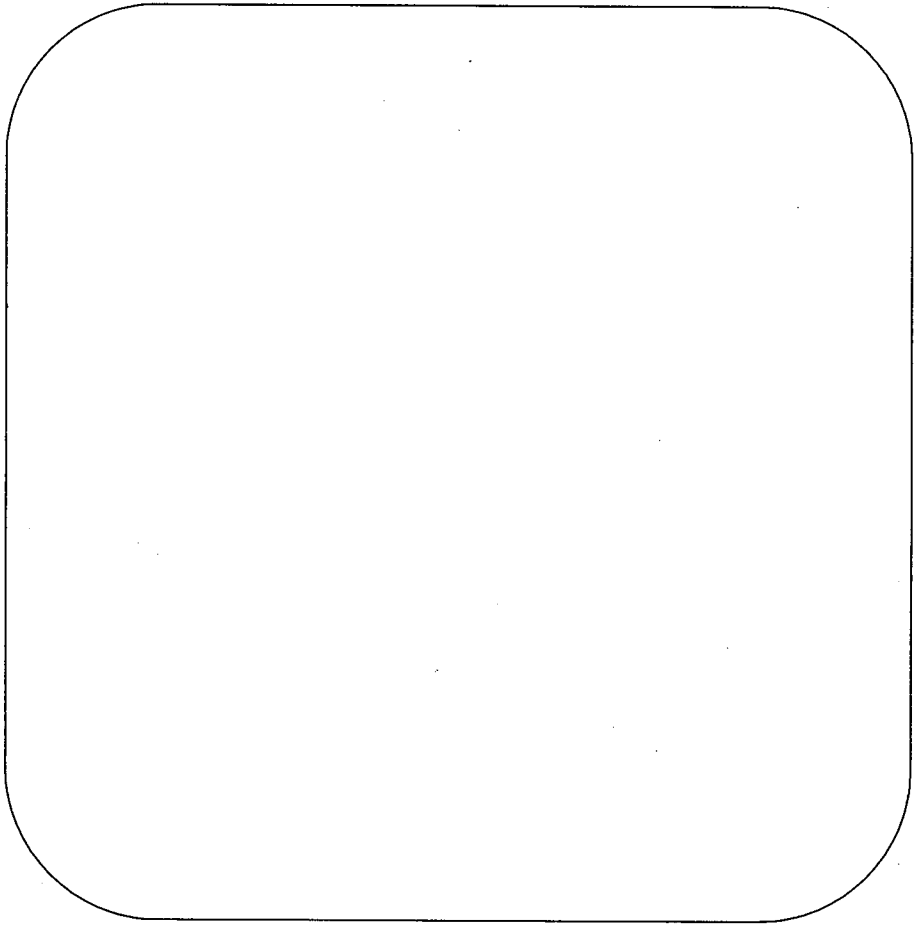
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 43 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$1.118.000.00.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/112508 A1

Descripción:

Páginas 32 en el idioma original

Páginas 53 en español

Reivindicaciones: Número (s) 53

Figuras: Número (s) 13

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 September 2009 (17.09.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/112508 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/10 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/052832

(22) International Filing Date:

11 March 2009 (11.03.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

UD2008A000055 13 March 2008 (13.03.2008) IT

(71) Applicant (for all designated States except US): **TRANS-ACTIVA SRL** [IT/IT]; Via Jacopo Linussio, 51, I-33100 Udine (IT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MARCHETTI, Stefano** [IT/IT]; Via dei Brazza, 29, I-33010 Pagnacco (IT). **BEMBI, Bruno** [IT/IT]; Via Guido Reni, 6, I-34123 Trieste (IT). **PATTI, Tamara** [IT/IT]; Via Beorcjete, 15, I-33030 Buja (IT). **CRISTIN, Piero** [IT/IT]; Via Garzarolli, 77, I-34170 Gorizia (IT).

(74) Agents: **PETRAZ, Davide Luigi** et al.; Glp Srl, Piazzale Cavedalis, 6/2, I-33100 Udine (IT).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: A METHOD FOR THE PRODUCTION OF A HUMAN PROTEIN IN A PLANT, IN PARTICULAR A HUMAN RECOMBINANT LYSOSOMAL ENZYME IN A CEREAL ENDOSPERM

(57) Abstract: A method for the production of a human protein in plant, in particular of a human recombinant lysosomal enzyme in a plant endosperm, comprising: - a first step of plant transformation whereby the protein is obtained and confined in an endosperm, which is not eventually absorbed by the embryo, and the presence of large quantities of the protein in the endosperm does not negatively affect seed viability and germination speed; - the use, in the first step of plant transformation, of an endosperm-specific promoter upstream the gene encoding said protein, and of a signal peptide for a co-translational transfer of the newly synthesized protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells for its tissue-specific accumulation; - a second step of protein accumulation inside the seed endosperm of a plant.

WO 2009/112508 A1

* * * * *

Genetically engineered plants could represent an alternative production system for lysosomal enzymes, in particular for recombinant acid beta-glucosidase, from

both a technological and economic point of view, since plant cultivation requires relatively inexpensive materials and agricultural infrastructures that already exist in the territory.

In WO-A-97/10353 (WO'353), the synthesis of lysosomal enzymes, comprising human acid beta-glucosidase, is reported exclusively in the leaf and, in particular, in the leaf of a biomass species such as tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). WO'353 describes a problematic method in which the high water content of leaf tissues (meaning a high dispersion of the protein of interest) and the presence of a great number of protein contaminants, polyphenols, rubbers, exudates, toxic alkaloids, contribute to complicating the processes of enzyme extraction and purification. Moreover, phytotoxic phenomena, caused by the alteration of normal plant metabolism, cannot be excluded; these phenomena are particularly relevant since they can occur unexpectedly and cannot be solved in a predictable way.

In WO'353, the expression of acid beta-glucosidase follows tobacco transformation with expression vectors harbouring the MeGa promoter (wound-inducible, derived from tomato HMG2 promoter) or the CaMV 35S promoter. The latter is a well-known, widely-used element for gene transcriptional control of constitutive type. In WO'353, it is stated that other constitutive or inducible promoters can be used for the same purpose.

As far as wound-inducible promoters are concerned, in WO'353 their use is strictly confined to the leaf, and plants must be previously wounded in order to express acid beta-glucosidase. Preliminary wounding determines an increase in costs, a more complex management of the production process and, in all likelihood, a partial enzyme degradation by proteinases normally resident in the vacuole or in other cellular compartments, as well as a heavier contamination of the wounded material with bacteria and fungi.

Light-inducible promoters virtually considered in WO'353 are not effectively expressed in tissues other than the leaf mesophyll, such as the seeds and particularly plant cereal seeds, due to the lack of transmitted light radiation and/or the lack of transcriptional factors normally present in photosynthetic tissues.

With respect to constitutive promoters, all examples are referred to the CaMV 35S promoter, also in view of its representativeness. However, experiments have

shown that the CaMV 35S transcriptional efficiency is marginally low in the seed, insomuch as to exclude any interest in the synthesis of heterologous proteins. This assertion is even more valuable in the case of monocot plants such as cereals, where this promoter appears less suitable to direct high gene
5 expression levels in the leaf tissues too.

In WO-A-03/073839 (WO'839), it has been reported that a gene coding for a mutated form of beta-glucosidase under the control of CaMV 35S promoter is not expressed in the seed at levels detectable in immunological assays carried out with a specific antibody.

10 Therefore, along with what is asserted in WO'839, it is possible to conclude that patent WO'353 does not actually provide the teachings to perform the production of human acid beta-glucosidase or other lysosomal enzymes in tissues different from the leaf mesophyll and specifically in the seed.

Furthermore, later experiments (Reggi et al. 2005, Plant Mol Biol 57: 101-113)
15 have demonstrated that the information given in WO'353 as to beta-glucosidase production in tobacco leaf allows to obtain enzyme quantities below the level of industrial attractiveness. Moreover, as indicated in WO'353, the enzyme quantities that can be purified from the leaf biomass are even smaller when expressed in terms of enzymatic activity, supporting the existence of
20 technological constraints in the leaf expression system, particularly in connection with the use of constitutive promoters.

In WO'839 it has been reported that lysosomal enzyme production in seed is possible and that the expression levels achieved with such system are adequate for its industrial exploitation. Moreover, it is stated that, since the enzymes are
25 accumulated in the apoplast (i.e. an extracellular compartment characterized by a subacidic pH), they can be preserved in a stable form for quite a long time.

However, WO'839 neither provides the teachings for the production of lysosomal enzymes, and in particular acid beta-glucosidase, in monocot plants nor does it give information on how to elude, minimize and overcome the problems and the
30 consequent limitations connected with tissue expression and subcellular localization of such enzymes, and in particular of acid beta-glucosidase, in the seed. As a matter of fact, these aspects are not handled at all for ignorance or negligence.

9

Actually, in WO'839 the examples dealing with the construction of expression vectors for lysosomal enzyme production always report the use of storage protein promoters of dicot plants. The examples concerning the actual expression of lysosomal enzymes are limited to a mutated form of acid beta-glucosidase and the host plant used is always tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). In the WO'839 description, no mention is made to the phytotoxic effects on transformed tobacco plants or on their progenies caused by acid beta-glucosidase accumulation in the seed, therefore the system may appear to be effective in solving the problems related to the production of lysosomal enzymes and, in particular, acid beta-glucosidase.

However, subsequent experiments carried out on the seed produced by tobacco plants transformed using the same construct cited in WO'839 revealed that beta-glucosidase accumulation determines important rebounds on seed viability. In particular, it has been demonstrated that, already at enzyme concentrations close to 200 U/kg of seed (1 U = amount of enzyme releasing one micromole of 4-methylumbelliferyl-D-glucoside per minute at 37°C, pH 5.9), there are reproductive anomalies caused by a low viability and a stunted germination. Moreover, above roughly 500 U/kg of seed, seed viability is completely impaired.

Further experiments carried out by the Applicant have shown that seed viability of tobacco transformed with the same construct cited in WO'839 cannot be restored in any known way. An Applicant investigation performed by electron microscopy has revealed a disorganization and a destructuration of the cell membrane system in unviable seed, confirming the inability to obtain a vital progeny from those transgenic lines that may theoretically be exploited for the industrial production of the enzyme. It has been verified, by electron microscopy, that the storage site achieved with the WO'839 construct does not actually correspond to that expected in WO'839 (apoplastic space) but to the storage protein vacuoles internal to embryo parenchymatic cells.

Similarly to WO'839, patent application WO-A-00/04146 (WO'146), which describes the expression of human lactoferrin and of proteins with a generic enzymatic activity in the plant seed, does not provide any teaching about the production of functionally active enzymes, least of all of lysosomal enzymes. In

- WO'146, no evidence is provided to support the effectiveness of the enzyme production process and problems related to the stability, conformation and functionality of said enzymes are totally neglected. In general, although in line of principle the plants needed for the production of industrial enzyme quantities could be obtained by in vitro propagation of elite plants, the use of this system would unavoidably complicate the production cycle due to the need for a large number of plants to be transplanted in the field in a relatively short time. In order to plan a 60 ton production of transgenic tobacco seed to satisfy Italy's human beta-glucosidase demand, an investment in at least 150 hectares of land and, above all, the in vitro production, greenhouse acclimatization and field transplantation of at least 9 million tobacco plants would be needed. With regard to process management and economic issues, this is clearly a very different situation from that resulting from transgenic seed broadcasting or sowing in narrow rows; these latter operations, feasible only with viable seed, would also allow a fourfold-sixfold higher seed production per unit of area compared to standard tobacco crops in view of the much higher plant density that can be achieved through them. The achievement of a plant density similar to that obtainable with direct sowing is unthinkable by transplantation as its cost would be insufficiently compensated from a productive point of view; in fact, there is an inverse proportion between plant production and plant number per unit of area. As to micropropagation costs, each plant should be handled individually and this, combined with the very low seed quantity (a few grams) produced by each tobacco plant, would drastically decrease the benefits of exploiting plants as host systems for lysosomal enzyme production.
- A purpose of the present invention is to carry out a process for the production of a human protein in a plant, particularly in a monocot plant, particularly of a recombinant human lysosomal enzyme in a cereal endosperm. The newly devised process overcomes the difficulties proper of the known technological state, more specifically:
- it allows an effective tissue expression and subcellular localization of lysosomal enzymes, and, in particular, of human acid beta-glucosidase and human acid alpha-glucosidase, inside the seed;
 - it facilitates both protein extraction and purification;

- 6 -

- it eliminates the risk of phytotoxic phenomena;
- it does not affect seed viability;
- it is economically more convenient;
- it greatly facilitates the management of the productive process;
- 5 - it eliminates the risk of partial enzyme degradation;
- it greatly reduces the level of bacterial and fungal contamination.

The Applicant has devised, tested and embodied the present invention to overcome the shortcomings of the state of the art and to obtain these and other purposes and advantages.

10 DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is set forth and characterized in the independent claims, while the relative dependent claims describe other characteristics of the invention or variants to the main inventive idea.

In accordance with the above-mentioned aims, a process for the production of a
15 human protein in plant, in particular of a recombinant human lysosomal enzyme in a plant endosperm, comprises:

- a first step of plant transformation by which the protein is obtained and confined in an endosperm which is not eventually absorbed by the embryo and by which the presence of large quantities of the protein in the endosperm does not
20 negatively affect seed viability and germination speed;
- the use, in the first step of plant transformation, of an endosperm-specific promoter upstream the gene encoding said protein, and of a signal peptide for a co-translational transfer of the newly synthesized protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells for its tissue-specific
25 accumulation;
- a second step of protein accumulation inside the seed endosperm of a plant.

The present invention allows the accumulation of a heterologous protein in storage tissues not belonging to the seed embryo. The present invention also favours the accumulation of a protein with a high phytotoxic/destructuring
30 potential in storage tissues not belonging to the seed embryo and spontaneously undertaking an apoptotic process at the end of development.

Moreover, it is possible to accumulate potentially phytotoxic proteins in non-vital tissues which will be subject to an intense hydrolytic activity after seed

imbibition and germination.

These potentially dangerous proteins can be accumulated within the protein storage vacuoles or protein bodies without being in contact with or crossing the cell membrane.

- 5 The present invention allows the production of exactly the intended amino acid sequences rather than non-authentic variants of the protein characterized by the presence of additional amino acids which are useless if not potentially harmful in terms of protein trafficking, stability, biological activity and therapeutic use. The synthesized protein is advantageously accumulated in the endosperm within
- 10 protein storage vacuoles (PSVs) or protein bodies (PBs). Since protein extractability from PSVs or from PBs is rather similar, the localization of said protein in one or the other of the above-cited subcellular compartments is indifferent in terms of the validity of the present invention.

An embodiment of this invention implies the construction of an expression vector

15 for plant transformation which comprises a sequence harbouring the following elements:

- i) an endosperm-specific promoter of natural or artificial origin;
 - ii) a 5' UTR of natural or artificial origin;
 - iii) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding a signal
 - 20 peptide suitable to target the recombinant protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells and to determine the accumulation of said protein in a specific tissue;
 - iv) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding the mature form of the human protein;
 - 25 v) a 3' UTR of natural or artificial origin;
- and the use of such vector for plant transformation.

Advantageously, the nucleotide sequence of the expression vector is as reported in SEQ ID N°: 1.

According to an embodiment of this invention, the expression vector is

30 introduced into bacterial strains, which are directly or indirectly used for plant transformation. Advantageously, the selected bacterial strain belongs to a group which comprises *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*.

Transformed plants are preferably cereals.

According to a preferred embodiment, the bacterial strain is used for transformation of embryogenic calli of rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, inbred CR W3). According to an advantageous variant, the lysosomal enzyme is the human acid beta-glucosidase. In another variant, the lysosomal enzyme is the human acid alpha-glucosidase.

Actually, the present invention is equally effective in the synthesis, extraction and purification of significant amounts of human acid alpha-glucosidase precursor, which has a molecular mass, structure and function that is completely different from acid beta-glucosidase.

According to an embodiment, the present invention comprises a third step consisting in industrial seed manufacturing.

According to a solution, the industrial manufacturing is designed to dehull and whiten the harvested mature seed in order to remove the fibrous components, the germ and the aleuronic layer containing a number of protein contaminants.

According to a further embodiment, the present invention comprises a fourth step of purification of the recombinant protein. The purification step preferably consists in a hydrophobic interaction chromatography, an ion exchange chromatography and a gel filtration, in that order. Moreover, the purification step may include, alternatively or additionally, the application of chromatographic resins with a chemical composition and/or structure and/or function similar to those indicated in the examples hereinafter reported, the partial modification of the elution conditions, the duplication of a passage, e.g. by reloading an eluted fraction into a column.

With the present invention the enzyme is purified in amounts which are easily larger than 100 U/kg of seed, or even up to 500 U/kg of seed. In addition, the purified enzyme is extremely active, it does not present deletions, additions or amino acid substitutions, resulting in this respect perfectly equal to the human native counterpart. Moreover, the accumulation of the enzyme in the endosperm does not determine any alteration of seed viability or germination speed.

The molecular cassette used for enzyme production is normally inherited by the progenies and, as any Mendelian factor, can be brought to homozygosis or transferred by crossing to other transformed lines, favouring in both cases an

increase in enzyme production.

The method related to the present invention, contrary to known technologies, is clearly innovative and advantageous because it allows to obtain transgenic lines, for example of rice, which are able to produce industrially relevant amounts of human acid beta-glucosidase, showing no alteration to the normal phenotype (both at a macroscopic and microscopic level) and in particular no reproductive anomaly or alteration in seed viability and germination speed, also with enzyme concentrations higher than 500 U/kg of seed. The process also allows to extract and purify the enzyme in a completely active form, maintaining the amino acid sequence unchanged as regards the human native counterpart.

Falling within the present invention is a nucleotide sequence suitable to be used for plant transformation with the aim to express a human protein, in particular a recombinant human lysosomal enzyme, in a plant endosperm; said nucleotide sequence comprises the following elements:

- i) an endosperm-specific promoter of natural or artificial origin;
- ii) a 5' UTR of natural or artificial origin;
- iii) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding a signal peptide suitable to target the recombinant protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells and to determine the accumulation of said protein in a specific tissue;
- iv) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding the mature form of the human protein;
- v) a 3' UTR of natural or artificial origin.

According to an embodiment of the present invention, the promoter i) is the rice glutelin 4 promoter (GluB4pro), the sequence of which is indicated in SEQ ID N°: 2.

According to an advantageous embodiment, the 5' UTR ii) is the leader known as LLTCK, described in patent application PCT/EP2007/064590 and reported in SEQ ID N°: 3.

According to a further embodiment, the nucleotide sequence of the element iii) is the sequence of PSGluB4, as indicated in SEQ ID N°: 4, encoding the signal peptide used by rice to target the glutelin 4 precursor into the endoplasmic reticulum.

According to another embodiment, the nucleotide sequence of the element iv) is the GCase sequence, encoding the mature form of the human acid beta-glucosidase, as indicated in SEQ ID N°: 5.

According to an advantageous embodiment of the invention, the 3' UTR of element v) is the NOS terminator, the sequence of which is indicated in SEQ ID N°: 6. Alternatively, the terminator of GluB4 gene can be used.

Typically, the whole nucleotide sequence of the expression cassette is the same as that reported in SEQ ID N°: 1.

Falling within the present invention are the nucleotide sequences complementary to those above-mentioned.

Falling within the present invention are the sequences derived from mutagenic processes, such as deletions, insertions, transitions, transversions of one or more nucleotides of the above-mentioned sequences or of their complementary sequences.

Falling within the present invention are the combinations of the above-mentioned sequences encoding the mature form of human acid beta-glucosidase with promoter elements and/or sequences for protein targeting to the endoplasmic reticulum and/or untranslated regions in 5' and 3' different from those reported in the sequence as indicated in SEQ ID N°: 1, suitable to obtain the synthesis and accumulation of the enzyme specifically in the seed endosperm, or with nucleotide sequences complementary to said sequences.

Falling within the present invention are the combinations of the elements i), ii), iii), iv) and v) as described above with mature enzyme encoding sequences different from those reported in SEQ ID N°: 1 for the presence of mutations or polymorphisms internal to the human species or combinations made with their complementary sequences.

Moreover, falling within the present invention are also the combinations of the elements i), ii), iii), iv) and v) as mentioned above with sequences encoding mature forms or precursors of other lysosomal enzymes, or combinations made with their complementary sequences.

Furthermore, falling within the present invention are also the above-cited combinations, in which the enzyme is the human acid alpha-glucosidase.

Falling within the present invention is also a sequence as mentioned above, in

which the transformed plants are cereals.

Falling within the present invention is a molecular vector for the expression of a human protein in a plant, in particular of a human lysosomal enzyme in a plant endosperm, harbouring said nucleotide sequence. Typically, the molecular
5 expression vector is a plasmid.

According to an advantageous solution, the lysosomal enzyme is the human acid beta-glucosidase.

Alternatively, the lysosomal enzyme is the human acid alpha-glucosidase.

Falling within the present invention is also the use of the above-cited expression
10 vector for plant transformation with the aim to produce a protein, in particular a human lysosomal enzyme.

Falling within the present invention is also a bacterial strain containing the expression vectors as described above. Advantageously, that bacterial strain can be chosen from a group comprising *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*
15 and *Agrobacterium rhizogenes*.

Falling within the present invention are the plant cells transformed with expression vectors as those cited above.

According to a solution of the present invention, those cells are cereal cells, preferably belonging to cultivated rice (*Oryza sativa* L.). There is a preference
20 for rice varieties unsuitable for use as food. Hence, falling within the present invention is the use of waxy rice, industrially exploitable for the extraction and production of starch and its by-products.

Alternatively, cells may belong to a member of the *Graminaceae* family (*Poaceae*), e.g. maize (*Zea mays* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat
25 (*Triticum* spp.).

Falling within the present invention is also the seed of a plant transformed for the expression of a human protein, in particular of a human lysosomal enzyme, which contains an expression vector as described above.

According to a solution of the invention, the seed of the transformed plant
30 belongs to a cereal species, preferably the transformed plant belongs to the rice species *Oryza sativa* L.

The field of protection related to the present invention also comprises a transformed plant for the expression of a human protein, in particular of a human

lysosomal enzyme, obtained with the use of an expression vector as mentioned above. Advantageously, such plant is a cereal, preferably belonging to the rice species *Oryza sativa* L.

Falling within the present invention are also the progenies obtained by self-fertilization or crossing, or transformed lines selected from the above-mentioned transformed plant.

The present invention also refers to a seed as described above for therapeutic treatment. Moreover, the invention also refers to the use of the aforementioned seed for the production of an ERT drug. In particular, it refers to enzyme replacement therapy for the following diseases: Gaucher disease, Glycogenosis type II, Fabry disease, Niemann-Pick B disease, Mucopolysaccharidoses I, II, IV. The invention also refers to a seed as cited above to be used in enzyme replacement therapy. In particular, the invention refers to a seed as mentioned above to be used in the enzyme replacement therapy of the following diseases: Gaucher disease, Glycogenosis type II, Fabry disease, Niemann-Pick B disease, Mucopolysaccharidoses I, II, IV.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

These and other characteristics of the present invention will become apparent from the following description of a preferential form of embodiment, given as a non-restrictive example with reference to the attached drawings wherein:

- fig. 1 is a scheme of the final expression vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] used for the endosperm-specific production of the human enzyme acid beta-glucosidase;
- fig. 2A shows an experimental scheme of the method for the synthesis by recursive-PCR of the LLTCK leader downstream the GluB4 promoter;
- fig. 2B shows the results of electrophoretic analyses of duplex-PCR products obtained from genomic DNA extracted from putatively transformed plants with primer couples annealing to the *GCase* and *HPT II* genes. Lane 1: 1 Kb ladder (NEB); lane 2: negative control (NC), i.e. genomic DNA extracted from a non-transformed plant; lane 3: positive control (PC), i.e. pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] vector; lanes 4-16: tested plants;
- figs. 3A and 3B show the results of SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analyses carried out on protein extracts obtained in the course of extraction trials

- from seed of GCase transformants. In A and B, lanes 1-5 are loaded with serial consecutive extractions of the whitened rice sample, lanes 6 and 7 with two consecutive extractions of the whitening waste. Positive control (PC): in Western blotting, it corresponds to 100 ng of purified imiglucerase. It is evident that most of the recombinant human acid beta-glucosidase contained in whitened rice can be recovered with three serial extractions;
- fig. 4A shows the results of Western blot analyses carried out on protein extracts obtained from seed of GCase transformants. Lane 1: marker Precision Plus Protein standard (BioRad); lane 2: positive control (PC, 100 ng imiglucerase); lane 3: negative control (NC, protein extract from non-transformed rice, inbred CR W3); lanes 4-10: seed protein extracts of different primary transformants;
 - fig. 4B shows the three glycoforms of human acid beta-glucosidase detected with Western blot analysis after a 2-dimensional electrophoresis of a seed protein extract from a GCase transformed plant;
 - fig. 5A and 5B report an image of immunolocalization obtained by transmission electron microscopy (magnification 12500X) on a seed section of a non-transformed rice (A) and a GCase transformant (B). It is evident that the accumulation of recombinant human acid beta-glucosidase involves only the protein storage vacuoles (PSVs);
 - figs. 6A and 6B shows an example of HIC (A) and IEC (B) chromatograms where the elution peaks containing the recombinant human acid beta-glucosidase are indicated;
 - fig. 7 reports in a graph the fluorescence recorded in 4-MUG assays carried out with different chromatographic aliquots relative to NC (non-transformed plant) and a GCase transformant. The results of the associated Western blot analyses are also reported. EX: raw extract; R: flow through; E: elution aliquots; PC: positive control (imiglucerase). It is evident that the true GCase activity (E2-E3) can be separated from the endogenous GCase-like one (E6) with IEC;
 - figs. 8A and 8B show the results of a SDS-PAGE analysis (A) carried out on recombinant human acid beta-glucosidase after the final purification step with gel filtration and the corresponding Western blot signal (B);
 - fig. 9 reports the mass spectrum obtained by MALDI-TOF analysis on a

GCase sample purified by HIC and IEC;

- fig. 10 shows a schematic representation of GAA gene assembling in pUC18 from the initial artificially-synthesized fragments;
- fig. 11 shows a schematic representation of the strategy adopted to achieve the final expression vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/GAA/ NOSTer];
- fig. 12 shows the results of a Western blot analysis carried out on total protein extracts obtained from different GAA transformants. Lane 1: M, marker Precision Plus Protein standard (BioRad); lane 2: NC (seed protein extract from a non-transformed plant); lane 3: PC (100 ng of Myozyme); lanes 4-10: seed protein extracts obtained from different primary transformants.
- fig. 13 shows the results of an immunogold labelling of mature seed endosperm carried out with an anti-GAA antibody. It is evident that GAA is specifically detected in the protein storage vacuoles (PSVs) and not in the protein bodies (PBs). No signal was ever detected in the negative control (seed produced by an untransformed plant)(data not shown). Magnification: 16000X.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENT INVENTION

The present invention refers, in particular, to a method for the production of human acid beta-glucosidase in the seed endosperm of cultivated rice (*Oryza sativa* L.); the method comprises:

- a first step of plant transformation whereby the protein is obtained and confined in an endosperm, which is not eventually absorbed by the embryo, and the presence of large quantities of the protein in the endosperm does not negatively affect seed viability and germination speed;
 - the use, in the first step of plant transformation, of an endosperm-specific promoter upstream the gene encoding said protein, and of a signal peptide for a co-translational transfer of the newly synthesized protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells for its tissue-specific accumulation;
 - a second step of protein accumulation inside the seed endosperm of a plant.
- In the plant transformation method, the use of an expression vector containing the following elements is envisaged:
- i) an endosperm-specific promoter of natural or artificial origin;
 - ii) a 5' UTR of natural or artificial origin;

iii) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding a signal peptide suitable to target the recombinant protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells and to determine the accumulation of said protein in a specific tissue;

5 iv) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding the mature form of the human protein;

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

The nucleotide sequence contained in the expression vector is, for example, that indicated in SEQ ID N°: 1.

10 Among the possible known endosperm-specific promoters of *Graminaceae* plants and in particular of rice, the present invention advantageously exploits the promoter of the GluB4 gene (the sequence of which is reported in SEQ ID N°: 2), because the GluB4-encoded protein presents a more uniform distribution inside the seed endosperm. Moreover, the GluB4 promoter has a higher transcriptional
15 activity compared to promoters of genes encoding other storage proteins within rice endosperm, like globulins, prolamins, or glutelins other than GluB4.

The GluB4 promoter was isolated by PCR from the waxy rice inbred CR W3 (selected by Ente Nazionale Risi, Milan) together with its leader region. Since the native leader is rather short and scarce in repeated CAA and CT elements, which
20 have a positive influence on gene expression, it was eventually substituted with the 5' UTR known as LLTCK (De Amicis et al. 2007, Transgenic Res 16: 731-738) and reported in the international patent application PCT/EP2007/064590 and indicated in SEQ ID N°: 3.

The sequence GluB4pro/LLTCK was ligated with PSGLuB4/GCase, where:

25 - PSGLuB4 is the sequence (as indicated in SEQ ID N°: 4) encoding the signal peptide used by rice glutelin 4 precursor to enter the endoplasmic reticulum;
- GCase is the sequence (as indicated in SEQ ID N°: 5) encoding the mature form of human acid beta-glucosidase; the mature form consists in the precursor protein deprived of the native signal peptide.

30 In order to avoid the addition of foreign amino acids at the N-terminus of the mature protein, which could result from the introduction of endonuclease restriction sites eventually used for cloning or sequence connection, the DNA region corresponding to the PSGLuB4 sequence and the initial part of the mature

21
GCase coding sequence (until the naturally-occurring *Hind* III restriction site) was artificially synthesized.

The sequence of PSGluB4 resulting from such synthesis does not match with the natural rice sequence, although it is fully synonymous, due to changes that have
5 been deliberately introduced to favour a better recognition of the translation start codon in association with LLTCK and to avoid the occurrence of rare codons or unfavourable intercodon contexts. On the contrary, the GCase initial part was maintained unaltered with respect to the human native sequence, so the whole GCase sequence corresponds exactly to the GenBank accession N° M16328, in
10 the interval between nucleotide positions 553 and 2046. After connection of the synthetic sequence with that encoding the remaining part of the enzyme through the *Hind* III restriction site, the whole complex was ligated at the 3' terminus of GluB4pro/LLTCK, previously cloned in the pSV2006 binary vector. pSV2006 was developed by the Applicant from pCAMBIA 1300 plasmid
15 (www.cambia.org); the polyadenilation signal used for the human acid beta-glucosidase construct was NOS ter, i.e. the terminator of *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase gene. The NOS terminator sequence is reported in SEQ ID N°: 6.

After checking all the sequences used in the construction of the final vector
20 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] (fig. 1), this vector was introduced into the EHA 105 strain of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Then, the engineered strain was used for the transformation of rice embryogenic calli (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, inbred CR W3). The whole procedure of plant transformation and regeneration on selective medium was
25 regularly completed. No differences were observed between transformed and control plants grown in climatic chambers under the same conditions of light, temperature and humidity. The female and male organ fertility and the percentage of flower abortion in transgenic plants were found comparable with those observed in non-transformed plants of the CR W3 inbred. All primary
30 transformants produced seed with a mean viability higher than 95%, irrespectively of the level of human acid beta-glucosidase expression. Moreover, the germination speed matched the maximum values of the species (within 4-6 days, almost all of the viable seed developed primary roots and the coleoptile).

Similarly to primary transformants, also their progenies grew normally and produced seed containing recombinant human acid beta-glucosidase. The presence of the enzyme encoding gene was verified by PCR analyses in all putatively transformed plants (fig. 2B) and in over 150 randomly-sampled progenies of the best primary transformants obtained by selfing. In these analyses, negative and positive controls, corresponding respectively to total DNA of non-transformed CR W3 plants and to miniprep extractions of the expression vector, were used. Furthermore, the amplifiability of each tested DNA extract was also demonstrated, making use of a specific primer couple designed on a rice chloroplastic DNA region. On the whole, PCR analyses demonstrated that the rice genome is transformed with the sequence encoding the human acid beta-glucosidase enzyme and the transgene is transmitted to progenies. The hereditary transmission was demonstrated not only in selfed progenies but also in those derived by crossing transformed plants with negative controls or with other transformed plants. In order to verify the production of the human acid beta-glucosidase messenger RNA, immature rice seeds (10-15 days after flowering) were harvested and used for total RNA extraction. On the latter, the following analyses were performed: a. absence of genomic DNA contamination by PCR; b. amplification of the human acid beta-glucosidase messenger RNA by RT-PCR; c. amplification of the glutelin 4 messenger RNA by RT-PCR. In all the cases, the GCase gene appeared regularly expressed and showed the same expression pattern of the gene encoding the glutelin 4 storage protein. As expected, when total RNA from negative control was used, only the amplification of glutelin 4 gene was obtained.

Immature seed was also used to immunolocalize the recombinant protein by transmission electron microscopy. This work demonstrated that the human acid beta-glucosidase is accumulated exclusively in the protein storage vacuoles of the endosperm cells. When the same analysis was repeated on the CR W3 control seed, no signal was obtained; this demonstrated the great effectiveness of the analysis and the absolute specificity of the anti-GCase antibody we used. The availability of a specific antibody together with the possibility to measure beta-glucosidase activity through a reliable and sensitive fluorimetric assay were exploited to select the best transgenic lines and to develop a purification

23

procedure of the recombinant protein. Concerning the extraction and purification processes, protocols were developed for preliminary seed manufacturing, crude protein extraction and recombinant acid beta-glucosidase isolation and purification. The purification protocol consists in three serial steps: a

5 hydrophobic interaction chromatography (HIC), a cation exchange chromatography (IEC) and gel filtration (GF). Seed dehulling and whitening were absolutely useful for removing the large part of protein contaminants with a minimal GCase loss; losses were also very low during the extraction steps. The removal of the endogenous GCase-like enzyme, responsible for a GCase-like

10 activity, was obtained through a discontinuous elution process applied at the end of cation exchange chromatography. This chromatography allowed a further decrease of protein contaminants assigning to the gel filtration step the role of sample polishing.

In SDS-PAGE, the purified protein showed essentially the same mobility of

15 imiglucerase (Cerezyme, Genzyme Corp.) and an apparent molecular weight of about 60 kDa. In Western blotting, the purified protein was strongly detected by an anti-imiglucerase antibody raised in rabbit. The purified protein was found to be enzymatically active; in particular, it efficiently hydrolyzed the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl beta-D-glucoside, showing the same reaction

20 kinetic of imiglucerase. In 2-D electrophoresis, the single band repeatedly detected in Western blot analyses carried out after standard SDS-PAGE split in at least three protein glycoforms. Further analyses demonstrated the integrity of recombinant human acid beta-glucosidase produced in rice endosperm and the identity of its amino acid sequence with the human native counterpart. N-

25 terminus microsequencing demonstrated that the initial nonapeptide corresponds to ARPCIPKSF which is also the N-terminus of human native acid beta-glucosidase. Peptide mass fingerprinting performed in MALDI-TOF showed that also the C-terminus of the protein is fully conserved and that, similarly to what was observed in the native enzyme, no glycan chains are found in the fifth N-

30 glycosylation site. Differently, the first, second, third and fourth N-glycosylation site of the protein appeared to be occupied. The presence of N-glycans in the first site is essential for the enzymatic activity of the protein.

EXAMPLES

Example 1: Construction of the molecular cassette for GCase expression

The following section describes a method for the endosperm-specific expression of human acid beta-glucosidase in rice. Similar methods can be used to carry out variants of the construct, characterized by the presence of other endosperm-specific promoters and/or sequences for protein targeting into the endoplasmic reticulum.

Isolation of the Glutelin 4 promoter (GluB4pro)

In order to isolate the Glutelin 4 promoter of *Oryza sativa* (GenBank acc. N° AY427571), a PCR on genomic DNA of CR W3 inbred was performed. In such PCR, the following primers were used:

Primer GluB4pro for: as indicated in sequence SEQ ID N°: 7.

Primer GluB4pro rev: as indicated in sequence SEQ ID N°: 8.

In order to favour subsequent cloning, the GluB4pro for primer was designed to insert the *Sph* I and *Eco* RI restriction sites at the 5' end of the amplicon; similarly, the GluB4pro rev primer was designed to introduce a *Xba* I site at the 3' end of the PCR product.

Cycle: 95°C for 2'; 40x (95°C for 45"; 63°C for 40"; 72°C for 2'); 72°C for 5'.

The amplified product was cloned into pGEM-T (Promega) and fully sequenced.

Substitution of native leader with LLTCK artificial leader in GluB4 promoter

In order to substitute the native leader of rice Glutelin 4 promoter (GluB4pro) with the synthetic leader LLTCK (De Amicis et al. 2007, Transgenic Res 16: 731-738), three serial PCR were performed with suitable primers (one forward primer and three reverse primers) according to the scheme of fig. 2A.

In the first PCR, the plasmid pGEM-T[GluB4pro] was used as template; in the following two, the template was the product of the previous reaction. The forward primer 1 starts with a *Bfr* I restriction site and anneals close to the 3' end of the GluB4pro sequence. The reverse primer 1 anneals with its 3' end to the GluB4pro region immediately upstream the leader region. The part which does not anneal contributes to the synthesis of the initial LLTCK tract. The reverse primer 2 anneals to the latter fragment and determines the synthesis of the second part of the LLTCK leader sequence. Finally, the reverse primer 3 introduces the terminal portion of the LLTCK sequence as well as a *Xba* I site at the 3' edge. PCR reactions were carried out using the Accu Taq (Sigma) DNA polymerase

and the following temperature cycling: 98°C for 2'; 15 (I and II PCR) or 25(III PCR) x (94°C for 30"; 65°C for 30"; 68°C for 1'); 68°C for 10'. The final PCR product was cloned into pGEM-T and verified by enzymatic digestion and sequencing. In order to replace the GluB4pro native leader sequence with the
5 artificial LLTCK leader, the *Bfr* I and *Xba* I restriction sites were used. Vector and insert were ligated with the T4 DNA ligase and the resulting vector pGEM-T[GluB4pro/LLTCK] was verified by PCR analyses and enzymatic digestion.

Substitution of the native signal peptide with the SPGluB4

To increase GCase expression in rice, the nucleotide sequence encoding the
10 signal peptide of glutelin 4 (SPGluB4) was optimized on the basis of rice codon usage and put in front of the sequence encoding the mature form of human acid beta-glucosidase (GCase). In order to prevent the addition of foreign amino acids at the N-terminus of the mature enzyme, the addition of spurious endonuclease restriction sites at the edges to be connected was avoided. To solve the problem,
15 an artificial fragment including a *Xba* I site at the 5' end, the SPGluB4 sequence and the GCase initial region till the naturally-occurring *Hind* III site was produced and cloned into pUC57 (Fermentas). After a check of the sequence, it was cloned in place of the fragment encoding the native signal peptide inside pGEM-T[GCase], i.e. the plasmid containing the entire sequence encoding the
20 human acid beta-glucosidase as reported in GenBank N° M16328. Both pUC57[SPGluB4] and pGEM-T[GCase] were digested with *Xba* I and *Hind* III in order to generate the insert and the vector backbone, respectively. These parts were jointed together with T4 DNA ligase to produce pGEM-T[SPGluB4/GCase] which was checked by enzymatic digestion.

25 Assembly of the molecular cassette for human acid beta-glucosidase expression in rice

The regions corresponding to GluB4pro/LLTCK and SPGluB4/GCase were subcloned in two steps into pUC18[NOSter]; this plasmid was derived from pUC18 (Pharmacia) by inclusion of the NOS polyadenylation sequence of
30 *Agrobacterium tumefaciens*. For this purpose, the restriction sites introduced at the 5'- and 3' end of each region were exploited, namely *Sph* I and *Xba* I for GluB4pro/LLTCK, *Xba* I and *Sac* I for SPGluB4/GCase.

Production of the pSV2006[GluB4pro/LLTCK/SPGluB4/GCase/NOSter] vector

To obtain the final expression vector, pSV2006 (a pCAMBIA 1300 derivative) was used. Through *Eco* RI digestion, the original expression cassette of pSV2006 and the molecular construct contained in pUC18[GluB4pro/LLTCK/SPGluB4/GCase/NOSter] were removed. The pSV2006 backbone and the insert of interest were ligated each other to obtain the final expression vector (fig. 1), which was subject of specific analyses before its transfer into *Agrobacterium tumefaciens*, strain EHA 105 by electroporation. The engineered *Agrobacterium tumefaciens* strain was used for transformation of *Oryza sativa* ssp. *japonica*, inbred CR W3.

10 Example 2: rice transformation via *Agrobacterium tumefaciens*

Rice transformation was carried out according to the Hiei's protocol (Hiei et al., 1994), modified by C. Hüge (Rice Research Group, Institute of Plant Science, Leiden University) and E. Guiderdoni (Biotrop program, Cirad, Montpellier, France). The main phases of the procedure are briefly reported below:

15 Development of embryogenic calli

Rice transformation was performed using scutellum-derived embryogenic calli. In order to induce callus proliferation from the scutellum tissue, rice seed was dehulled, disinfected to eliminate potential pathogens and saprophyte contaminants, washed several times with sterile distilled water, dried on sterile blotting paper and transferred to Petri dishes containing the callus induction medium (CIM). Dishes were incubated at 28°C for 7 days in the dark; after that period, scutelli were excised from the seedling and cultivated on CIM for 14 days at 28°C in the dark. At the end of the induction period, callus masses were selected on the basis of the presence of tiny white calli. These last were transferred to fresh CIM and cultivated for 10 days to develop embryogenic callus suitable for transformation.

25 Co-cultivation of calli with *Agrobacterium tumefaciens*

In order to obtain a sufficient amount of *Agrobacterium tumefaciens* for transformation, the strain harbouring the expression vector was incubated for 3 days at 30°C on LB agar. The layer of agrobacterium cells was collected and resuspended in the liquid co-cultivation medium (CCML) until an O.D.₆₀₀ of 1.00 was reached (approx. $3\cdot 5\cdot 10^9$ cells/mL). The best calli, i.e. those compact, white-coloured and 2 mm in diameter, were dipped into the bacterial suspension. After

blotting onto sterile Whatman paper, calli were transferred onto co-cultivation medium (CCMS) at a density of 20 per high-edge Petri dish (Sarstedt) and incubated for 3 days at 25°C in the dark.

Selection of hygromycin-resistant calli

- 5 At the end of the co-cultivation period, calli were transferred onto selection medium I (SMI) and incubated at 28°C for 2 weeks in the dark. The calli were eventually transferred onto selection medium II (SMII) and incubated for another week at the same conditions.

Plant regeneration from transformed calli

- 10 The regeneration of transformed plants was reached through an appropriate hormonal stimulation. Embryogenic hygromycin-resistant calli were selected, transferred onto the pre-regeneration medium (PRM) and incubated inside high-edge Petri dishes at 28°C for 1 week. Calli were then transferred onto regeneration medium (RM) in the number of 8-10 per Petri dish. Plant
15 regeneration occurred at 28°C for 3-4 weeks in the light. When plants were sufficiently developed to be separated from the callus (≥ 3 cm in height), they were transferred in culture tubes containing 25 mL of rooting medium (ROT). Tubes were maintained for about 3 weeks at 28°C in the light. At the end of the regeneration process, plants were potted in peat and grown to maturity in a
20 confined phytotrone at 24°C, 85% relative humidity, under metallic alogen lamps Osram Powerstar® HQI®-BT 400 W/D (photoperiod 16 h light/8 h dark).

Example 3: total protein extraction from rice seeds transformed with GCCase construct

- Transgenic rice seeds were firstly dehulled and whitened with Satake TO-92
25 (Satake Corporation, Japan). Whitened rice seeds were then milled and the resulting flour was homogenized in the extraction buffer (50 mM sodium acetate, 350 mM NaCl, pH = 5.5), using a ratio between buffer volume (mL) and flour weight (g) equal to 10:1.5. After incubation at 4°C for 1 hour, samples were centrifuged at 14000xg for 45 minutes. After supernatants recovery, the
30 remaining pellets were used for two further extractions with the same procedure. Protein extracts obtained from the whitened seed and whitening waste were both analysed in SDS-PAGE (fig. 3A and 3B) and Western blotting. These analyses demonstrated that most of the recombinant human acid beta-glucosidase is

contained in whitened seed and that it can be efficiently recovered with three consecutive extractions.

Example 4: Western blot analysis and 2-D electrophoresis on total protein extracts of GCCase transformed seed

5 Total protein extracts were separated in SDS-PAGE (Laemli, 1970) using a Mini Protean II apparatus (BioRad) and a 0.75-mm thick 10% polyacrylamide gel. Before loading, samples were denaturated at 100°C for 5 minutes, without beta-mercaptoethanol. After SDS-PAGE, proteins were transferred on polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Immobilon-P^{SQ} by Millipore) with a Trans-Blot SD
10 apparatus (BioRad) at 15V for 30 minutes. Sample were then hybridised with a polyclonal anti-GCase antibody produced by immunizing two rabbits with commercial imiglucerase. The following hybridization conditions were applied: incubation for 1 hour at room temperature using a dilution equal to 1:1000 in blocking solution (7.5% p/v Oxoid skim milk in PBS). After washes in PBS
15 Tween 0.1% v/v, an anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Sigma, dilution 1:10000) was incubated for 1 hour at room temperature. Then chemiluminescence was developed with ECL PlusTM (GE Healthcare). To determine the molecular weight of the positive protein bands, the Precision Plus Protein standard (BioRad) was used together with HRP-conjugated Precision
20 Streptactin antibody (BioRad)(fig. 4A).

Two samples containing about 200 µg of seed total protein were analyzed by isoelectrofocusing and SDS-PAGE. The first analysis was performed with PROTEAN IEF focusing system (BioRad) and ReadyStrip IPG of 7 cm, with a non-linear pH range of 3-10 (BioRad). Protein extracts were precipitated with 2D
25 Clean-Up kit (GE Healthcare) and resuspended with 130 µL of DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare) and 0.6% Byolites ampholytes 3-10 (BioRad). The following running conditions were applied:

- step 1: 250 V for 15 minutes
- step 2: 4000 V for 2 hours
- 30 step 3: 20000 V-hour for approx. 24 hours.

At the end of the run, strips were washed with two different equilibration buffers: equilibration buffer I (2% DTT, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glycerol and 0.002% bromophenol blue, pH = 8.8) for 15 minutes and

equilibration buffer II (2.5% iodoacetamide, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glycerol and 0.002% bromophenol blue, pH = 8.8) for 20 minutes. Samples were run in the second dimension in two separate gels according to a standard SDS-PAGE protocol. One electrophoretic gel was stained with Colloidal Coomassie Blue (0.08% Coomassie Blue R-250, 1.6% orto-phosphoric acid, 8% ammonium sulphate, 20% methanol), while the other was analysed by Western blotting (fig. 4B). The whole procedure was performed in parallel also for protein samples obtained from non-transformed CR W3 seeds.

Example 5: determination of the GCase storage site by immunolocalization

Transformed seeds in the late milky phase were harvested, dehulled, cut into fragments of 1 mm and fixed in 0.2% glutaraldehyde for 1 hour at room temperature. After a wash in 0.15 M phosphate buffer, a dehydration with a gradient of absolute ethanol (from 25 to 100%) was performed. Dehydrated samples were embedded in LR White Resin (London Resin Co.) and finally polymerized at 60°C for 24 hours. Sections (2-3 µm thick) were cut with a LKB Nova microtome (Reichter), placed on nickel mesh grids (Electron Microscopy Sciences), incubated for 15 minutes with a goat normal serum solution (Aurion), diluted 1:30 in buffer C (0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2% BSA) and eventually hybridized for 1 hour at room temperature with the primary anti-GCase antibody diluted 1:500 in buffer C. After several washes in buffer B (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl) with 0.1% Tween 20 w/v (6 x 5 minutes), sections were incubated for 1 hour at room temperature with the secondary antibody conjugated with colloidal gold (15 nm, Aurion) diluted 1:40 in buffer E (0.02 M Tris-HCl, pH 8.2 containing 0.9% NaCl and 1% BSA). At the end of hybridization, sections were washed and stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) and finally observed with Philips CM 10 transmission electron microscope (TEM).

The results obtained showed the presence of GCase only in protein storage vacuoles (PSVs) of seed endosperm; the polyclonal anti-GCase antibody allowed to identify GCase with a strong and clear signal, in the absence of significant background. The same analyses carried out on non-transformed rice grains confirmed the high specificity of the anti-GCase antibody by the lack of any evidence for matrix-associated cross-reacting sites (figs. 5A and 5B).

Example 6: recombinant human acid beta-glucosidase purification from rice seed

For the purpose of purification, an industrially-scalable protocol was developed; the protocol is based on a first capturing step obtained with a hydrophobic interaction chromatography (HIC) (fig. 6A); an intermediate step based on ion
5 exchange chromatography (IEC) (fig. 6B); a final polishing step carried out with gel filtration. All chromatographic steps were performed with the AKTA Prime system (GE Healthcare).

Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

This step was performed with a HiTrap Octyl FF of 5 mL (GE Healthcare). At
10 the beginning of the procedure, the column was equilibrated with one volume of loading buffer (50 mM sodium acetate, 350 mM NaCl and 100 mM ammonium sulphate, pH=5.5); before sample loading, a 3 M ammonium sulphate solution was added to a clarified extract to gain the final concentration of 100 mM ammonium sulphate and then the extract was filtered through a 0.2 mm filter
15 (Millipore). The sample was applied to the column at 1 mL/min flow rate. The column was washed with three volumes of loading buffer and with 50 mM sodium acetate, pH 5.5 until a flat baseline. Elution was carried out with 66% ethylene glycol in 50 mM sodium acetate. At the end of the procedure, the column was washed and regenerated with 20% ethanol.

Ion exchange chromatography (IEC)

For IEC, a HiTrap SP FF of 5 mL (GE Healthcare) containing a cationic resin was used. The column was equilibrated with 50 mM sodium acetate (soln. A); then, the HIC eluted fraction, diluted 1:1 with the same buffer, was loaded. After column washing, a discontinuous gradient elution was performed using
25 increasing amounts of NaCl equal to 15, 20 and 100% of a 1 M solution in soln. A. At the end, the column was regenerated with 20% ethanol. Immunologic assays carried out on aliquots collected from each chromatographic operation demonstrated that recombinant human acid beta-glucosidase is eluted with the solution containing 20% of NaCl. Enzymatic activity tests performed on eluted
30 fractions obtained from protein extracts of non-transformed seed showed that the separation of human acid beta-glucosidase from the endogenous component responsible for a GCase-like activity occurs in this chromatographic step. In particular, it was established that at 20% NaCl concentration the endogenous

component is efficiently retained in the column (fig. 7).

Gel filtration

For gel filtration, a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution column (GE Healthcare) and a elution buffer composed of 20 mM sodium acetate and 200 mM NaCl, pH 5.5 were used. The column was initially washed with two volumes of the buffer, then the IEC eluted product was loaded at a 0.3 mL/min flow rate. The peak of interest was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (figs. 8A and 8B).

Example 7: determination of GCase enzymatic activity

Recombinant human GCase activity was assayed using 4-MUG (4-methylumbelliferyl β -D-glucoside, Sigma) as substrate. The reaction mixture contained 75 mM potassium phosphate buffer pH 5.9, 0.125% w/v taurocholate and 3 mM 4-MUG. The reaction was carried out at 37°C for 1 h, using 10 μ L of sample in 300 μ L of assay solution. The reaction was stopped adding 1690 μ L of 0.1 M glycine-NaOH, pH 10.0. The enzymatic activity was measured with a fluorimeter at an excitation wavelength of 365 ± 7 nm and an emission wavelength equal to 460 ± 15 nm. One unit (U) was defined as the amount of enzyme releasing one micromole of substrate per minute. Different sample quantities were tested in comparison with known amounts of commercial imiglucerase. The fluorimetric assay demonstrated that recombinant human GCase produced in rice endosperm is active and characterized by the same reaction kinetic of commercial imiglucerase.

Example 8: determination of the N-terminal sequence of recombinant GCase

The correctness of GCase N-terminal sequence was ascertained by protein microsequencing. For this purpose, an enzyme aliquot was purified with HIC and IEC, loaded in a SDS-polyacrylamide gel and, at the end of electrophoresis, transferred to a PVDF membrane using the Trans-Blot Semi-Dry apparatus (transfer conditions: 25 V for 30 minutes in 10 mM CAPS buffer and 10% methanol, pH 11.0). After the transfer, the membrane was stained with 0.25% (w/v) Coomassie-blue R-250 solution in 50% methanol for 5 minutes, washed with water and destained with a 50% methanol solution for 10 minutes to visualize the band corresponding to the protein of interest. Microsequencing was carried out according to the Edman degradation procedure (Edman, 1950). The

analysis showed the presence of a nonapeptide (ARPCIPKSF) perfectly overlapping with the N-terminal sequence of the mature form of human acid beta-glucosidase. Therefore, it can be concluded that the rice glutelin 4 signal peptide is well recognized by the ER membrane system and correctly removed during the internalization process.

Example 9: MALDI-TOF analysis on purified GCase

Protein digestion with trypsin

After gel electrophoresis and staining with 0.25% (w/v) Coomassie-Blue R-250 water solution, 50% methanol, 10% glacial acetic acid, the protein band corresponding to recombinant GCase was cut and washed at 37°C with 300 µL of 100 mM NH₄HCO₃ and 100% acetonitrile (ACN) (50:50 v/v) solution, pestled and dehydrated with further 100 µL of ACN. The protein band was subsequently treated with 50 µL of 20 mM DTT in 100 mM NH₄HCO₃ at 56°C for 1 hour to obtain a reduction of disulfide bridges and alkylated with 50 µL of 50 mM IAA (iodoacetamide) in 100 mM NH₄HCO₃ for 30 minutes. Furthermore, the protein band was washed with 300 µL of 100 mM NH₄HCO₃, then with 300 µL of 20 mM NH₄HCO₃ and 100% ACN (50:50 v/v) solution and dehydrated again with the addition of 100 µL ACN. Finally, the protein band was rehydrated with 5-10 µL of digestion buffer containing 100 mM NH₄HCO₃ and 50 ng/µL trypsin (Promega); after 30 minutes, 20 µL of 20 mM NH₄HCO₃ were added. After sample incubation at 37°C overnight, the buffer containing the tryptic peptides was removed and a further peptide extraction was performed by adding 10 µL of 2% formic acid and 60% ACN (50:50 v/v) solution to the sample. The two extracts were pooled together and used for MALDI-TOF analyses (Perkin Elmer).

Peptide purification by C18 resin

The tryptic digest was purified and desalted with a C18 zip-tip (Millipore). Tips were washed four times with 10 µL of 100% ACN and three times with 10 µL of 0.1% TFA (trifluoroacetic acid). The sample was then added to the activated tips; after washes with 0.1% TFA, the peptides bound to the inverse phase resin of C18 zip-tip were eluted with 10 µL of 100% ACN and 0.1% TFA at a ratio 70:30 (v/v).

33

Protein identification by Peptide Mass Fingerprinting in MALDI-TOF mass spectrometry

Sample preparation for MALDI-TOF analyses was performed by adding 1 μ L of CHCA resin (α -ciano-4-hydroxycinnamic acid) concentrate solution placed on a metallic support to 1 μ L of purified peptides. The analysis (fig. 9) demonstrated that the protein purified with the procedure described in example 6 surely corresponds to the human acid beta-glucosidase. In particular, its identification was obtained with a score of 10^{-32} and a sequence coverage with recognized peptides equal to 53%. These results are of absolute guarantee, considering that the level of significance is reached with a score $\leq 10^{-6}$ and a percent coverage $\geq 30\%$. Interestingly, both the N-terminus and the C-terminus of the protein were found among the peptides recognized in MALDI-TOF (see table 1 for the complete list).

Tab. 1: main assignments of the tryptic peptides analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry

Mteorical	ΔM	assignment
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

34

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

Example 10: production of the GAA expression vector

This example describes a method for the endosperm-specific expression of human acid alpha-glucosidase in rice. In particular, the realization of the final expression vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/GAA/NOSter] is reported. This vector was realized by replacing the GCase gene with the GAA gene in the previous-mentioned pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] vector.

The coding sequence of the human acid alpha-glucosidase (GenBank Acc. N° NM_000152) was modified in order to increase transgene expression levels in rice endosperm; the new GAA coding sequence was rewritten on the basis of rice codon usage. Furthermore, it was decided to replace the native GAA signal peptide with PSGluB4, i.e. the same transit peptide used to target recombinant GCase in the ER lumen. Since the GAA coding sequence is 2850 bp long, it was artificially synthesized in three fragments (A, B and C). In order to assemble these fragments in a clearly oriented fashion, specific enzyme restriction sites were introduced by synonymous point mutation at their edges. A *Xba* I and *Sac* I site was introduced respectively at the 5' end of the first fragment and at the 3'

- 30 -

end of the third fragment to ease cloning of the whole GAA gene into pSV2006. The assembly of the three GAA fragments was performed in the pUC18 vector (fig. 10); after having checked its whole sequence (SEQ ID N°: 9), the gene was excised from pUC18 by digestion with *Xba* I and *Sac* I and cloned in substitution
5 of the GCase gene within pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter], to give the final expression vector pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GAA/NOSter] (fig. 11).

Example 11: Western blotting on GAA protein extracts

Five dehulled seeds were ground with 1 mL of 350 mM NaCl in 50 mM sodium
10 phosphate buffer (pH = 6.2) using mortar and pestle. The resulting homogenate was incubated on ice for 1 h under agitation and then centrifuged at 15000xg for 45 min at 4°C. The supernatant (20 µg soluble protein) was loaded in a 10% polyacrylamide gel together with Precision Protein Standard (BioRad). The gel was electroblotted to a 0.2 µm PVDF membrane (Millipore) with the Trans-blot
15 SD apparatus (BioRad). The blot was blocked with 7.5% non-fat dry milk in PBS buffer (Oxoid) for 1 h at room temperature. After washing, the primary rabbit polyclonal antibody, produced using lyophilized alpha alglucosidase (MyozymeTM, Genzyme Corp.) as antigen, was diluted 1:5000 in the blocking buffer and the blot was incubated for 1 h at room temperature. Then, the HRP-
20 conjugated secondary antibody (Sigma Aldrich) was diluted 1:10000 and the membrane incubated for 1 h at room temperature. After the final washes, chemiluminescence was developed with ECL plus (GE Healthcare Bio-Sciences) (fig. 12).

Example 12: Immunolocalization of recombinant GAA in rice endosperm

25 The procedure was quite similar to that described for rice seeds transformed with the GCase construct.

Briefly, approximately 10-15 days after flowering, immature rice seeds were dehydrated and embedded in LR White Resin (London Resin Co. Ltd., Hamshire, UK). Blocks were polymerized at 60°C for 24 h. Ultra-thin sections were cut
30 with the ultramicrotome LKB Nova (Reichert) and mounted on nickel grids (Electron Microscopy Sciences) for immunolocalization. Sections were incubated with Normal Goat Antiserum (Aurion) diluted 1:30 in buffer C for 15 min and then with the anti-GAA serum (the same used for Western blot analyses) diluted

1:100 in buffer C for 1.5 h at room temperature. After washing, the sections were incubated for 1 h with a solution of goat anti-rabbit antibody conjugated with 15 nm colloidal gold (Aurion) diluted 1:40 in 0.02 M Tris-HCl pH 8.2 containing 0.9% NaCl and 1% BSA. Sections were stained with 0.1% lead citrate (Reynolds, 5 1963) and examined with a Philips CM10 transmission electron microscope (TEM). The same procedure was carried out on a sample derived from non-transformed rice.

As observed in sections of GCase seed, the immunogold labelling of GAA seed endosperm showed that the recombinant enzyme is specifically localized within 10 protein storage vacuoles (PSVs) (fig. 13). No signals were ever detected in protein bodies (PBs) or in the CR W3 negative control.

Example 13: ELISA on GAA protein extracts

Before performing ELISA, 2 ml of the anti-GAA antiserum antibody, produced in rabbit as mentioned in example 11, were purified by a Hitrap rProtein A FF 15 column of 1 ml (GE Healthcare). Then the purified IgGs were conjugated to horseradish peroxidase (HRP) using the EZ-Link® Maleimide activated Horseradish peroxidase kit (Pierce) as reported in the following protocol: 100 µL of Maleimide conjugation buffer were added to the 6-mg vial of 2-MEA; the solution was added to the IgG sample and the mixture incubated for 90 minutes 20 at 37°C. After equilibration at room temperature, the IgG/2-MEA solution was applied to a desalting column, pre-equilibrated with 30 mL of Maleimide conjugation buffer. Subsequently, Maleimide conjugation buffer was added to the column and fractions of 0.5 mL were collected. To locate the protein peak, the absorbance of each fraction was read at 280 nm; the fractions containing the 25 reduced IgG were pooled and added to the vial of activated HRP. The reaction was incubated for 1 hour at room temperature. Finally, a gel filtration using a superdex 200 10/300 GL column in Maleimide coating buffer (containing PBS and EDTA) was performed. The eluted peak was concentrated by Amicon Ultra-10 (Millipore) till a concentration of 0.85 µg/µL. The quality of the HRP- 30 conjugated anti-GAA antibody was tested by ELISA. For this purpose, 1 mg/mL of antigen Myozyme was coated on a plate; after blocking, the conjugated was added in different dilutions and incubated at 37°C for 30 minutes. The detection was performed using TMB substrate (3, 3', 5, 5''-tetramethylbenzidine); the

lowest detection limit of the antigen was obtained with a 1:1000 dilution of the HRP-conjugated anti-GAA antibody.

This antibody was then used to perform a sandwich ELISA on crude protein extracts as described below.

- 5 The coating was performed by adding 100 μ L of 15 ng/ μ L purified anti-GAA antibody in microwells of the ELISA plate and incubating at 4°C overnight.
- After blocking with 3% BSA in PBS for 1 hour at room temperature and a rinse with PBS 0.1% Tween-20, total protein seed extracts (diluted 1:10 or 1:100 in PBS, 0.1% Tween-20 and 1% BSA) were added and incubated for 30 minutes at
- 10 37°C. At the end of incubation, three washes were done and then the HRP-conjugated anti-GAA antibody was added to a dilution of 1:40 in PBS, 0.1% Tween-20 and 1% BSA and incubated for 30 minutes at 37°C. After four washes, the detection was performed using TMB substrate.

- On the basis of ELISA tests carried out with known amounts of standard
- 15 Myozyme, seed protein samples obtained from GAA primary transformants showed an average GAA content equal to 0.5% of total soluble proteins.

- It is clear that modifications and/or additions of parts or steps may be made to method for the production of a human protein in a plant, in particular a human recombinant lysosomal enzyme in a cereal endosperm as described heretofore,
- 20 without departing from the scope of the present invention.

- It is also clear that, although the present invention has been described with reference to some specific examples, a person of skill in the art shall certainly be able to achieve many other equivalent forms of the method for the production of method for the production of a human protein in a plant, in particular a human
- 25 recombinant lysosomal enzyme in a cereal endosperm having the characteristics as set forth in the claims and hence all coming within the field of protection defined thereby.

SEQUENCE LISTING

<110> Transactiva S.r.l.

<120> A method for the production of a human protein in a plant, in particular a human recombinant lysosomal enzyme in a cereal endosperm

5 <130> V3-4707

<150> UD2008A000055

<151> 2008-03-13

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 3357

<212> DNA

<213> Expression cassette

<400> 1

15 gaattctaca gggttccttg cgtgaagaag ggtggcctgc ggttcacat taacggtcac 60

gactactcc agctagtact ggtgaccaac gtcgcggcgg cagggtcaat caagtccatg 120

gaggttatgg gttccaacac agcggattgg atgccgatgg cacgtaactg gggcgcccaa 180

tggcactcac tggcctacct caccgggtcaa ggtctatcct ttagggtcac caacacagat 240

gaccaaacgc tcgtcttcac caacgtcgtg ccaccaggat ggaagtttg ccagacattt 300

20 gcaagcaagc tgcagtcaa gtgagaggag aagcctgaat tgataccgga gcgtttcttt 360

tgggagtaac atctctggtt gcctagcaaa catatgattg tatataagtt tcgttgtgcg 420

tttattcttt cgggtgtgtaa aataacatac atgctttcct gatattttct tgtatatatg 480

tacacacaca cgacaaatcc ttccatttct attattattg aacaatttaa ttgcgagggc 540

gagtacttgt ctgtttacct ttttttttc agatggcatt ttatagtta acctttcatg 600

25 gaccgggcagt agttctaacc atgaatgaaa agaaatcata gtccacacca cgcagggaca 660

ttgtgggcat ttagacaag acgatttgat taatgtcttg tatgatatgg tcgacagtga 720

ggactaacia acatatggca tttttatta cggcgaggtt aaataaattt atgtcacagt 780

aataaactgc ctaataaatg cacgccagaa aatataatga taaaaaaaag aaaagataca 840

taagtccatt gcttctactt ttttaaaaat taaatccaac attttctatt ttttggtata 900

30 aacttggaag tactagtggg atatgcaaaa tcatctaacc tccatatatt tcatcaattt 960

gtttacttta catatgggag aggatagtat gtcaaagaaa atgacaacia gcttacaagt 1020

ttcttatttt aaaagttccg ctaacttate aagcatagtg tgccacgcaa aactgacaac 1080

aaaccaacia atttaaggag cgcctaactt atcatctatg acataccgca caaaatgata 1140

	acatactaga	gaaactttat	tgcacaaaag	gaaatttata	cataaggcaa	aggaacatct	1200
	taaggctttg	gatatacatt	taccaacaag	cattgtttgt	attacccta	aagcgcaaga	1260
	catgtcatcc	atgagtcata	gtgtgtatat	ctcaacattg	caaagctacc	tttttctat	1320
	tatacttttc	gcattatagg	ctagatatta	tctatacatg	tcaacaaact	ctatccctac	1380
5	gtcatatctg	aagattcttt	tcttactat	ataagtggc	tccctgtca	ttgaactcac	1440
	atcaaccagc	ccaacacgta	ttttacaac	aataccaaca	acaacaaca	caaacaacat	1500
	tacaattacg	tatttctctc	tctagaatgg	ccaccattgc	gttctcccgg	ctgtccatct	1560
	acttctgcgt	gctgctgctg	tgccacggct	ccatggccgc	ccgccccctgc	atccctaaaa	1620
	gcttcggcta	cagctcggtg	gtgtgtgtct	gcaatgccac	atactgtgac	tccttgacc	1680
10	ccccgacctt	tctgcccctt	ggtaccttca	gccgctatga	gaglacacgc	agtgggcgac	1740
	ggatggagct	gagtatgggg	cccatccagg	ctaatacac	gggcacaggc	ctgctactga	1800
	ccctgcagcc	agaacagaag	ttccagaaag	tgaagggatt	tggagggggc	atgacagatg	1860
	ctgctgctct	caacatcctt	gccctgtcac	cccctgcca	aaatttgcta	cttaaategt	1920
	acttctctga	agaaggaatc	ggatataaca	tcatccgggt	acccatggcc	agctgtgact	1980
15	tctccatccg	cacctacacc	tatgcagaca	cccctgatga	ttccagttg	cacaacttca	2040
	gcctcccaga	ggaagatacc	aagctcaaga	taccctgat	tcaccgagcc	ctgcagttgg	2100
	cccagegtcc	cgtttactc	cttgccagcc	cctggacatc	acccacttgg	ctcaagacca	2160
	atggagcggt	gaatgggaag	gggtcactca	agggacagcc	cggagacatc	taccaccaga	2220
	cctggggcag	atactttgtg	aagttcctgg	atgcctatgc	tgagcacaag	ttacagttct	2280
20	gggcagtgac	agctgaaaat	gagccttctg	ctgggctgtt	gagtggatac	cccttccagt	2340
	gcctgggctt	cacccctgaa	catcagcgag	acttcattgc	ccgtgacct	ggctctaccc	2400
	tcgccaacag	tactcaccac	aatgtccgcc	tactcatgct	ggatgaccaa	cgcttgctgc	2460
	tgccccactg	ggcaaagggtg	gtactgacag	accagaagc	agctaaatat	gttcatggca	2520
	ttgctgtaca	ttggtacctg	gactttctgg	ctccagccaa	agccacccta	ggggagacac	2580
25	accgcctggt	ccccaacacc	atgctctttg	cctcagaggc	ctgtgtgggc	tccaagttct	2640
	gggagcagag	tgtgcggcta	ggctcctggg	atcgagggat	gcagtacagc	cacagcatca	2700
	tcacgaacct	cctgtacat	gtggtcggct	ggaccgactg	gaaccttgcc	ctgaaccccg	2760
	aaggaggacc	caattgggtg	cgtaactttg	tcgacagtcc	catcattgta	gacatcacca	2820
	aggacacgtt	ttacaaacag	cccatgttct	accaccttgg	ccacttcagc	aagttcattc	2880
30	ctgagggctc	ccagagagtg	gggctggttg	ccagtcagaa	gaacgacctg	gacgcagtgg	2940
	cactgatgca	tccgatggc	tctgctgttg	tggtcgtgct	aaaccgctcc	tctaaggatg	3000
	tgcctcttac	catcaaggat	cctgctgtgg	gttctctgga	gacaatctca	cctggctact	3060
	ccattcacac	ctacctgtgg	catcgccagt	gagagctcga	tcgttcaaac	atttggaat	3120

	aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata taatttctgt	3180
	tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg	3240
	ttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc	3300
	gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgcattctat gttactagat cgaattc	3357
5	<210> 2	
	<211> 1448	
	<212> DNA	
	<213> GluB4pro	
10	<400> 2	
	tacagggttc ctlgcgtgaa gaaggggtggc ctgcgggtca ccattaacgg tcacgactac	60
	ttccagctag tactgggtgac caacgtcgcg gcggcagggt caatcaagtc catggagggt	120
	atgggttcca acacagcggg ttggatgccg atggcacgta actggggcgc ccaatggcac	180
	tcactggcct acctcaccgg tcaaggctta tcttttaggg tcaccaacac agatgaccaa	240
15	acgctcgtct tcaccaacgt cgtgccacca ggatggaagt ttggccagac atttgcaagc	300
	aagctgcagt tcaagtgaga ggagaagcct gaattgatac cggagcgttt ctttgggag	360
	taacatctct ggttgccatg caaacatatg attgtatata agtttcgttg tgcgtttatt	420
	cttcgggtgt gtaaaataac atacatgctt tctgtatatt ttctgtata tatgtacaca	480
	cacacgacaa atccttccat ttctattatt attgaacaat ttaattgca gggcgagtac	540
20	ttgtctgttt acctttttt ttccagatgg cattttatag tttaaccttt catggaccgg	600
	cagtagttct aacctgaat gaaaagaaat catagtccac accacgcagg gacattgtgg	660
	tcatttiaga caagacgatt tgattaatgt ctgtatgat atggtcgaca gtgaggacta	720
	acaacatat ggcatatttt attaccggcg agttaaataa atttatgtca cagtaataaa	780
	ctgcctaata aatgcacgcc agaaaatata atgataaaaa aaagaaaaga tacataagtc	840
25	cattgcttct actttttta aaattaaatc caacatttc tatttttgg tataaacttg	900
	gaagtactag ttggatatgc aaatcatct aacctccata tatttcatca attgtttac	960
	ttacatatg ggagaggata gtatgtcaaa gaaatgaca acaagcttac aagtttctta	1020
	ttttaaagt tccgctaact tatcaagcat agtgtgccac gcaaaactga caacaacca	1080
	acaatttaa ggagcgccta acttatcatc tatgacatac cgcacaaaat gataacatac	1140
30	tagagaaact ttattgcaca aaaggaaatt tatccataag gcaaaggaac atcttaaggc	1200
	ttggatata catttaccac caagcattgt ttgtattacc cctaaagcgc aagacatgic	1260
	atccatgagt catagtgtgt atatctcaac attgcaagc taccttttt ctattatact	1320
	tttcgatta taggctagat attatctata catgtcaaca aactctatcc ctacgtcata	1380

41

- 36 -

	tctgaagatt cttttcttca ctatataagt tggcttcct gtcattgaac tcacatcaac	1440
	cagcccaa	1448
	<210> 3	
5	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> LLTCK Leader sequence	
10	<400> 3	
	acacgtattt ttacaacaat accaacaaca acaacaacaa acaacattac aattacgtat	60
	ttctctctct aga	73
	<210> 4	
15	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Nucleotide sequence encoding SPGluB4	
20	<400> 4	
	atggccacca ttgcgttctc ccggctgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac	60
	ggctccatgg cc	72
	<210> 5	
25	<211> 1494	
	<212> DNA	
	<213> Nucleotide sequence encoding the mature form of human acid beta-glucosidase	
	<400> 5	
30	gcccgccctt gcatccctaa aagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgtg ctgcaatgcc	60
	acatactgtg actcctttga cccccgacc ttctctgccc ttggtacctt cagccgctat	120
	gagagtacac gcagtgggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatac	180
	acgggcacag gcctgtact gaccctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga	240

	tttgagggg	ccatgacaga	tgctgctgct	ctcaacatcc	ttgccctgtc	accccctgcc	300
	caaaatttgc	tacttaaadc	gtacttctct	gaagaaggaa	tcggatataa	catcatccgg	360
	gtacccatgg	ccagctgtga	cttctccatc	cgcacctaca	cctatgcaga	caccctgat	420
	gatttccagt	tgcacaactt	cagcctccca	gaggaagata	ccaagctcaa	gataccctg	480
5	attcaccgag	ccctgcagtt	ggcccagcgt	cccgtttcac	tccttgccag	cccctggaca	540
	tcacccactt	ggctcaagac	caatggagcg	gtgaatggga	aggggtcact	caagggacag	600
	cccggagaca	tctaccacca	gacctgggcc	agatactttg	tgaagttcct	ggatgcctat	660
	gctgagcaca	agttacagtt	ctgggcagtg	acagctgaaa	atgagccttc	tgctgggctg	720
	ttgagtggat	accccttcca	gtgcctgggc	ttcacccctg	aacatcagcg	agacttcatt	780
10	gcccgtgacc	taggtcctac	cctcgccaac	agtactcacc	acaatgtccg	cctactcatg	840
	ctggatgacc	aacgcttget	gctgccccac	tgggcaaagg	tggactgac	agaccagaa	900
	gcagctaaat	atgttcatgg	cattgctgta	cattggtacc	tggactttct	ggctccagcc	960
	aaagccacc	taggggagac	acaccgctg	ttccccaaca	ccatgctctt	tgcctcagag	1020
	gcctgtgtgg	gctccaagtt	ctgggagcag	agtgtgcggc	taggctcctg	ggatcgaggg	1080
15	atgcagtaca	gccacagcat	catcacgaac	ctcctgtacc	atgtggtcgg	ctggaccgac	1140
	tggaaccttg	ccctgaaccc	cgaaggagga	cccaattggg	tgcgtaactt	tgtcgacagt	1200
	cccatcattg	tagacatcac	caaggacacg	ttttacaaac	agcccatgtt	ctaccacctt	1260
	ggccacttca	gcaagttcat	tcctgagggc	tcccagagag	tggggctggt	tgccagtcag	1320
	aagaacgacc	tggacgcagt	ggcactgatg	catcccgatg	gctctgctgt	tgtggctgtg	1380
20	ctaaaccgct	cctctaagga	tgtgcctctt	accatcaagg	atcctgctgt	gggcttctg	1440
	gagacaatct	cacctggcta	ctccattcac	acctacctgt	ggcatcgcca	gtga	1494
	<210> 6						
	<211> 253						
25	<212> DNA						
	<213> NOS terminator sequence						
	<400> 6						
	gacgttcaa	acatttggca	ataaagtttc	ttaagattga	atcctgttgc	cggctcttgcg	60
	atgattatca	tataatttct	gttgaattac	gttaagcatg	taataattaa	catgtaatgc	120
30	atgacgttat	ttatgagatg	ggtttttatg	attagagtcc	cgcaattata	catttaatac	180
	gcgatagaaa	acaaaatata	gcgcgcaaac	taggataaat	tatcgcgcg	ggtgtcatct	240
	atgttactag	atc					253

	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Artificially synthesized primer sequence	
	<400> 7	
	gcatgcgaat tctacagggt tccttgctg	30
10	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Artificially synthesized primer sequence	
	<400> 8	
	tctagaagct attgaggat gttattggaa	30
	<210> 9	
20	<211> 2850	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Artificially synthesized GAA sequence	
25	<400> 9	
	atggccacca ttgcgtctc ccggtgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac	60
	ggctccatgg ccggccacat cctgctgcat gacttctgc tggcgctcg ggagctgtcc	120
	ggctccagcc cgggtgtgga ggagaccac ccggcgccacc agcaggggcg gtcccggccg	180
	ggcctcggg atgcgcagge gcaccgggc cggcctcggg ccgtgcccac ccagtgcgat	240
30	gtgcctcca actcccgtt cgactgcgcg ccggacaaag ccatcaccca ggagcagtgc	300
	gaggcgctg gctgctgta catccggcc aagcagggcc tgcaggggcg gcagatgggc	360
	cagccctggt gttcttccc tccctctat cctctctaca agctggagaa cctgtctcc	420
	tccgagatgg gctacaccgc caccctacc cggaccacgc ccacattct tccaaagac	480

	atcctcacc	tgccgctgga	tgtgatgatg	gagaccgaga	accggctgca	ttcaccatc	540
	aaagacc	ccaaccggcg	glatgaggtg	cctctggaga	cgcctcgggt	gcattcccgg	600
	gcgcccagcc	ctctgtactc	cgttgagtgc	tccgaggagc	ccttcggcgt	gattgtgcgg	660
	cggcagctgg	atggccgggt	gctgctcaac	accaccgttg	cgcctctgtt	cttcgccgac	720
5	cagttcctgc	agctgtccac	ctccctgccc	tcccagtaca	tcaccggcct	ggccgagcac	780
	ctgagccctc	tcatgtgtc	cacctctgg	accggatca	ccctgtggaa	ccgggacctg	840
	gcgcccacgc	cgggcgccaa	cctgtatggc	tccatccct	tctacctggc	gctggaggat	900
	ggcggatccg	cgcattgggt	gttctgtc	aactccaatg	ccatggatgt	tgtgtgcag	960
	cccagcccgg	cgtgtcctg	gcgggtccacc	ggcggcatcc	tggatgtgta	catcttctg	1020
10	ggcccggagc	cgaagtccgt	tgtgcagcag	tacctggatg	ttgttgcta	tcccttcatt	1080
	cctccctact	ggggcctggg	cttccacctg	tgccgggtggg	gtactcctc	caccgccatc	1140
	accgggcagg	ttgttgagaa	catgaccggg	gcgcatttcc	ctctggatgt	gcagtggat	1200
	gacctggact	acatggactc	ccggcgggac	ttacattca	acaaagatgg	cttcggggac	1260
	ttcccggcca	tgggtcagga	gctgcaccag	ggcggccggc	ggtacatgat	gattgttgac	1320
15	ccggccatct	cctctccgg	cccggccggc	tctaccggc	cctatgatga	gggcctgcgg	1380
	cgtggcgtgt	tcatcacaa	tgagaccggc	cagcctctca	ttggcaaagt	gtggccgggc	1440
	tccaccggt	tcccggactt	caccaatccc	accgcgtgg	cgtgggtggga	ggacatgggt	1500
	gccgagtcc	atgaccaggt	gcccttcgat	ggcatgtgga	ttgacatgaa	tgagccctcc	1560
	aacttcatcc	gtggctccga	ggatggctgt	cccaacaatg	agctggagaa	ccctccctat	1620
20	gtgccgggcg	ttgttgccgg	cacctgcag	gccgccacca	tctgcgcgtc	ctcccaccag	1680
	ttctgtcca	cccattacaa	cctgcacaa	ctgtatggcc	tcaccgaggc	cattgcgtcc	1740
	caccggggcg	tgggtgaaagc	gcgtggcacc	cggcccttcg	tgatctccc	gtccaccttc	1800
	gccggccatg	gccggatgc	cggccattgg	accggcgatg	tgtggctcctc	ctgggagcag	1860
	ctggcgctct	cggatccgga	gatcctgcag	ttcaacctgc	tgggcgtgcc	tctggttggc	1920
25	gccgatgtgt	gcggcttct	gggcaacacc	tccgaggagc	tgtgcgtgcg	gtggaccag	1980
	ctgggcgcgt	tctatccctt	catgcggaac	cacaactccc	tgtgtccct	gcctcaggag	2040
	ccctactcct	tctccgagcc	ggcgcagcag	gccatgcgga	aggcgctcac	cctgcggtac	2100
	gcgtgtctgc	ctcactgta	cacctgttc	caccaggcgc	atgttgccgg	cgagaccgtt	2160
	gcgcggcctc	tgttctgga	gtttccaaa	gactcctcca	cctggaccgt	tgaccaccag	2220
30	ctgctgtggg	gcgaggcgct	gctcatcacg	ccggtgtctgc	aggccggcaa	agccgaggtg	2280
	accggctact	tccctctggg	cacctggtat	gacctgcaga	ccgtgcccat	tgaggcgctg	2340
	ggctccctgc	ctcctctcc	ggccgcgcct	cgggagccgg	ccatccattc	cgagggccag	2400
	tgggtgacct	tgccggcgcc	tctggacacc	atcaatgtgc	acctgcgggc	cggctacatc	2460

- 40 -

	atccctctgc agggcccggg cctcaccacc accgagtcce ggcagcagcc catggcgctg	2520
	gccgttgegc tcaccaaagg cggcgaggcg cgtggcgagc tgttctggga tgatggcgag	2580
	tccctggagg tgctggagcg tggcgcgta acccaggtga tcttctggc gcggaacaac	2640
	accattgtga atgagctggt ccgggtgacc tccgaggcg cggcctgca gctgcagaaa	2700
5	gtgaccgtgc tgggcgttgc caccgcgcct cagcaggtgc tgtccaatgg cgtgccggtg	2760
	tccaacttca cctacagccc ggacacaaa gtgctggaca tctgcgtgc cctgctcatg	2820
	ggcgagcagt tcctggtgtc ctggtgctag	2850

CLAIMS

1. Method for the production of a human protein in plant, in particular of a recombinant human lysosomal enzyme in a plant endosperm, characterized in that it comprises:
- 5 - a first step of plant transformation whereby the protein is obtained and confined in an endosperm, which is not eventually absorbed by the embryo, and the presence of large quantities of the protein in the endosperm does not negatively affect seed viability and germination speed;
- 10 - the use, in the first step of plant transformation, of an endosperm-specific promoter upstream the gene encoding said protein, and of a signal peptide for a co-translational transfer of the newly synthesized protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells for its tissue-specific accumulation;
- 15 - a second step of protein accumulation inside the seed endosperm of a plant.
2. Method as in claim 1, characterized by protein accumulation within endosperm protein storage vacuoles (PSVs) or protein bodies (PBs).
3. Method as in claims 1 or 2, characterized by the construction of a plant expression vector for the transformation of such plants, containing a nucleotide sequence harbouring the following elements:
- 20 i) an endosperm-specific promoter of natural or artificial origin;
- ii) a 5' UTR of natural or artificial origin;
- iii) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding a signal peptide suitable to target the recombinant protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells and to determine the accumulation
- 25 of said protein in a specific tissue;
- iv) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding the mature form of the human protein;
- v) a 3' UTR of natural or artificial origin;
- and wherein the vector developed in this way for plant transformation is used.
- 30 4. Method as in claim 3, characterized in that the nucleotide sequence of the expression vector is as indicated in SEQ ID N°: 1.
5. Method as in claim 3 or 4, characterized in that the expression vector is introduced in bacterial strains, which are, directly or indirectly, used for plant

transformation.

6. Method as in claim 5, characterized in that the bacterial strain chosen belongs to a group which comprises *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*.

5 7. Method as in any claim hereinbefore, characterized in that the transformed plants are cereals.

8. Method as in claim 5 and 7 or 6 and 7, characterized in that the bacterial strain is used for the transformation of embryogenic calli of rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, inbred CR W3).

10 9. Method as in any claim hereinbefore, characterized in that the lysosomal enzyme is the human acid beta-glucosidase.

10. Method as in any of the claims from 1 to 8, characterized in that the lysosomal enzyme is the human acid alpha-glucosidase.

15 11. Method as in any claim hereinbefore, characterized in that it comprises a third step of plant seed industrial manufacturing.

12. Method as in claim 11, characterized in that the industrial manufacturing process submits the mature seeds harvested from transformed cereal plants to dehulling and whitening operations in order to eliminate the fibrous component, the germ and the aleuronic layer containing protein contaminants.

20 13. Method as in any claim hereinbefore, characterized by a fourth step of purification of the recombinant protein.

14. Method as in claim 13, characterized in that the purification step comprises a hydrophobic interaction chromatography, a ionic exchange chromatography and a gel filtration.

25 15. Method as in claim 13 or 14, characterized in that the purification step comprises the application of chromatographic resins that have similar chemical compositions and/or structure and/or functions, the partially modification of elution conditions, the duplication of a passage.

30 16. Nucleotide sequence suitable in plant transformation for the expression of a human protein, in particular of a recombinant human lysosomal enzyme in a plant endosperm, characterized in that it comprises the following elements:

- i) an endosperm-specific promoter of natural or artificial origin;
- ii) a 5' UTR of natural or artificial origin;

48

- iii) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding a signal peptide to target the recombinant protein into the lumen of the endoplasmic reticulum of the endosperm cells for its subsequent accumulation in a specific tissue;
- 5 iv) a nucleotide sequence of natural or artificial origin encoding the mature form of the human protein;
- v) a 3' UTR of natural or artificial origin.
17. Sequence as in claim 16, characterized in that the i) promoter is the rice glutelin 4 promoter (GluB4pro).
- 10 18. Sequence as in claim 16 or 17, wherein the ii) 5' UTR region is leader known as LLTCK.
19. Sequence as in claim 16, 17 or 18, characterized in that the nucleotide sequence of the iii) element is the PSGluB4 sequence encoding a signal peptide used in rice to target the precursor of glutelin 4 inside the endoplasmic reticulum.
- 15 20. Sequence as in any of claims from 16 to 19, characterized in that the nucleotide sequence of the iv) element is the GCase sequence encoding the mature form of human acid beta-glucosidase.
21. Sequence as in any of claims from 16 to 20, characterized in that the 3' UTR of the v) element is the NOS terminator or the terminator of the GluB4
- 20 gene.
22. Nucleotide sequence as in any of claims from 16 to 21, as indicated in SEQ ID N°: 1.
23. Sequence complementary to the nucleotide sequences as reported in any of the claims from 16 to 22.
- 25 24. Sequence deriving from mutation events, like deletions, insertions, substitutions of one or more nucleotides in sequences as in any of the claims from 16 to 22, or their complementary sequences as in claim 23.
25. Combination of nucleotide sequences as in any of the claims from 16 to 22 encoding the mature form of acid beta-glucosidase with elements, like promoters,
- 30 sequences for targeting to the endoplasmic reticulum and 5' and 3' untranslated regions, different from those reported in SEQ ID N°: 1, suitable to obtain the enzyme synthesis and storage specifically in the seed endosperm or with nucleotide sequences complementary to such sequences.

26. Combination of elements i), ii), iii), iv) and v) as in claim 16 with sequences encoding the mature enzyme that differ from that reported in SEQ ID N° 1 due to the presence of synonymous mutations or polymorphisms inside human species or combinations produced with nucleotide sequences complementary to such sequences.
27. Combination of nucleotide sequences elements i), ii), iii), iv) and v) as in claim 16 with sequences encoding mature forms or precursors of other lysosomal enzymes, or combinations produced with nucleotide sequences complementary to such sequences.
28. Combination as in claim 27, in which the enzyme is the human acid alpha-glucosidase.
29. Sequence as in any of the claims from 16 to 28, characterized in that the transformed plants are cereals.
30. Molecular vector for the expression of a human protein in a plant, in particular of a human recombinant lysosomal enzyme in a plant endosperm, comprising the nucleotide sequence as in any of the claims from 16 to 29.
31. Vector as in claim 30, characterized in that the lysosomal enzyme is the human acid beta-glucosidase.
32. Vector as in claim 30, characterized in that the lysosomal enzyme is the human acid alpha-glucosidase.
33. Vector as in claims 30, 31 or 32, characterized in that said vector is a plasmid.
34. Use of the expression vector as in any of the claims from 30 to 33 for the transformation of a plant for the production of a protein, in particular of a human lysosomal enzyme.
35. Bacterial strain harbouring vectors as in any of the claims from 30 to 33.
36. Bacterial strain as in claim 35, chosen in a group comprising the species *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*.
37. Plant cells transformed with an expression vector as in any of the claims from 30 to 33.
38. Cells as in claim 37, characterized in that said cells are cereal cells.
39. Cells as in claim 38 belonging to the cultivated rice species (*Oryza sativa* L.).

50

40. Cells as in claim 39 belonging to the *Graminaceae* family (*Poaceae*) like for example maize (*Zea mays* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum* spp.).
- 5 41. Seed of the transformed plant for the expression of a human protein, in particular of a human lysosomal enzyme, characterized in that it contains an expression cassette derived from a vector as in any of the claims from 30 to 33.
42. Seed as in claim 41, characterized in that the transformed plant belongs to the cereals.
- 10 43. Seed as in claim 41 or 42, characterized in that the transformed plant belongs to cultivated rice species (*Oryza sativa* L.).
44. Transformed plant for the expression of a human protein, in particular of a human lysosomal enzyme, characterized in that it is transformed by an expression vector as in any of the claims from 30 to 33.
45. Transformed plant as in claim 44, characterized in that it is a cereal.
- 15 46. Transformed plant as in claims 44 or 45 belonging to the cultivated rice species (*Oryza sativa* L.).
47. Progenies obtained by self-fertilization, natural or artificial crossing, or transformed lines selected from a transformed plant as in claims 44, 45 or 46.
48. Seed as in claims 41, 42 or 43 for therapeutical use.
- 20 49. Use of the seed as in claims 41, 42 or 43 for the production of a drug for enzyme replacement therapy.
50. Use of the seed as in claim 49 for the production of a medicine for the enzyme replacement therapy of the following diseases: Gaucher disease, Glycogenosis type II, Fabry disease, Niemann-Pick B disease,
- 25 Mucopolysaccharidoses I, II, IV.
51. Seed as in claims 41, 42 or 43 for use in enzyme replacement therapy.
52. Seed as in claim 51 for use in enzyme replacement therapy of the following diseases: Gaucher disease, Glycogenosis type II, Fabry disease, Niemann-Pick B disease, Mucopolysaccharidoses I, II, IV.
- 30 53. Method for the production of a human protein in a plant, in particular of a human recombinant lysosomal enzyme in a cereal endosperm, as described above, with reference to the attached figures.

51

1/8

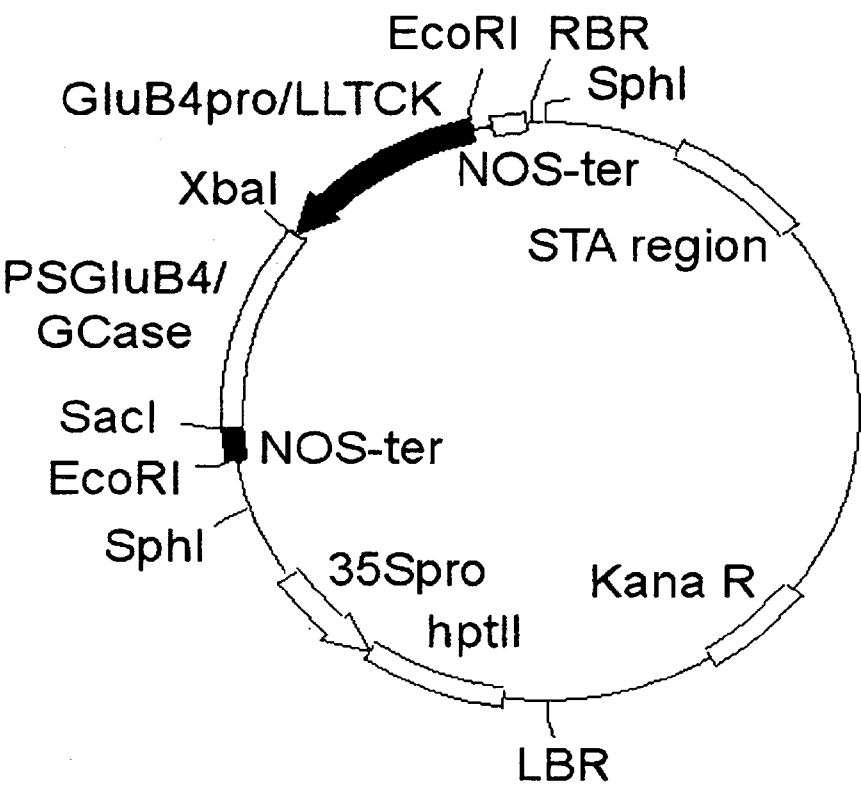


Fig. 1

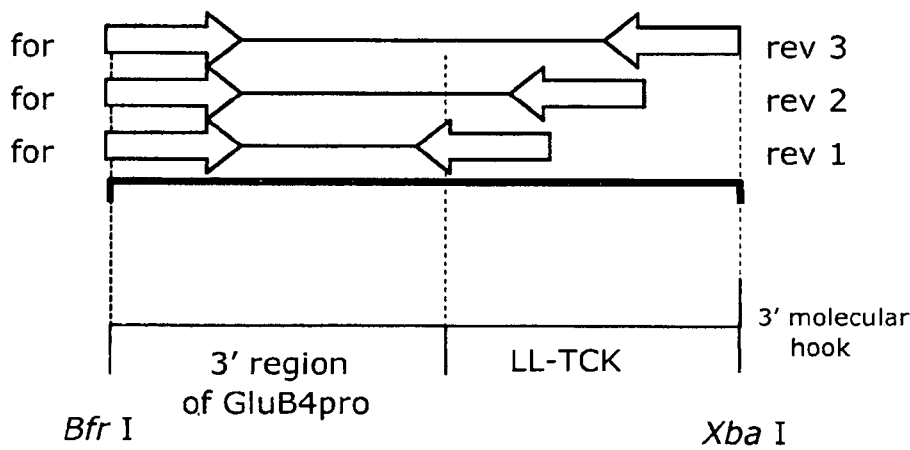


Fig. 2A

2/8

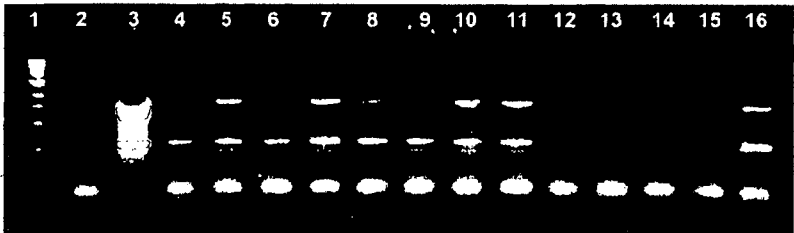


Fig. 2B

A 1 2 3 4 5 6 7

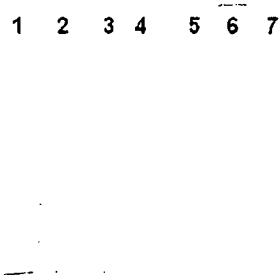


Fig. 3A

B

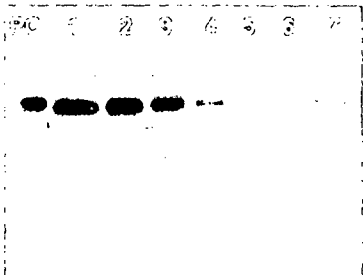


Fig. 3B

A
75 kDa
50 kDa

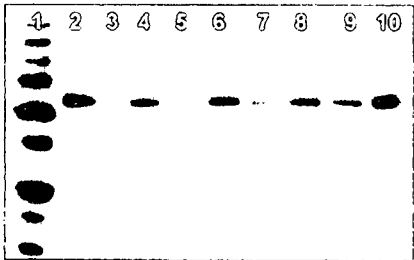


Fig. 4A

B

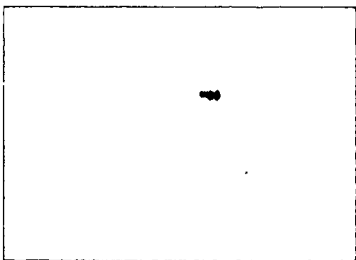


Fig. 4B

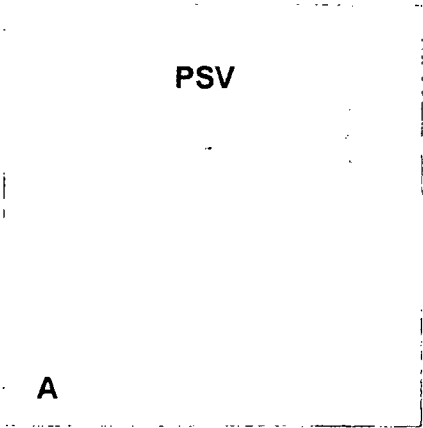


Fig. 5A

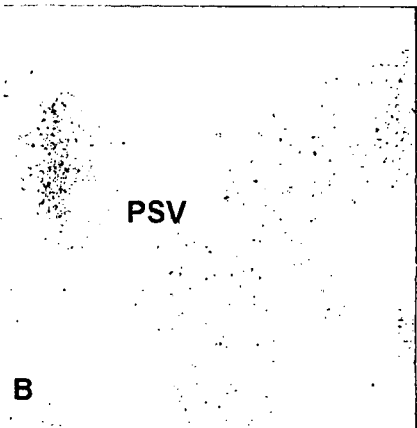


Fig. 5B

3/8

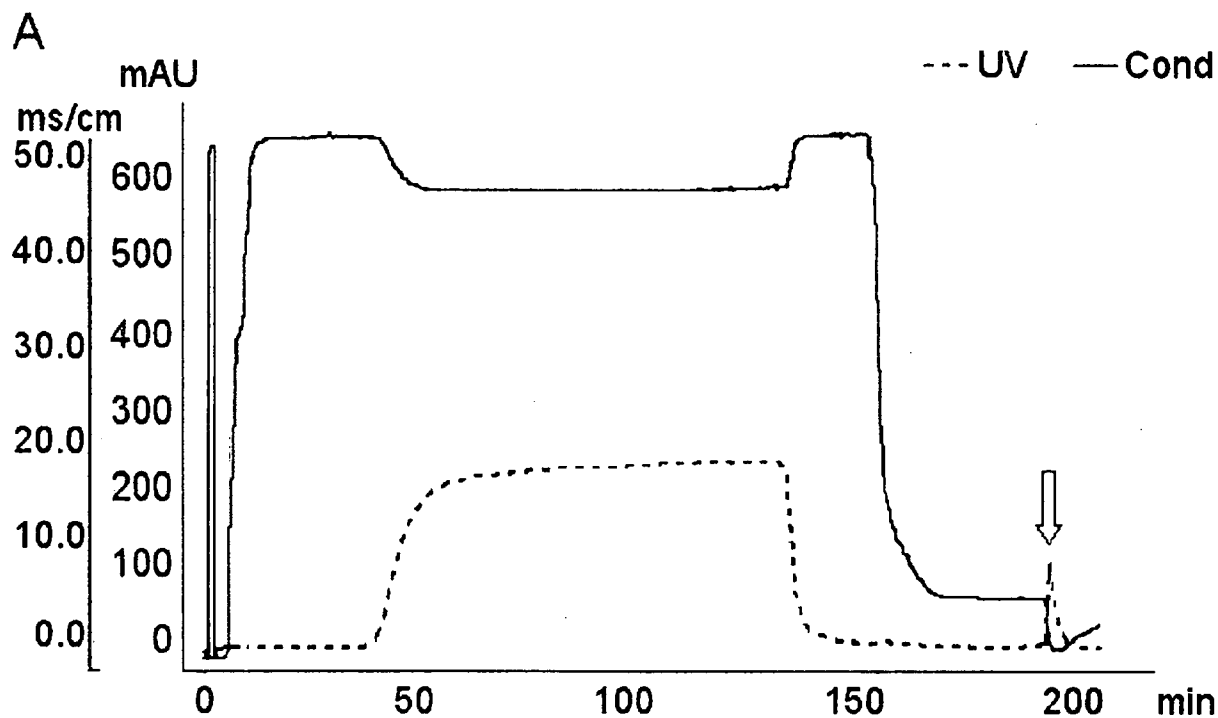


Fig. 6A

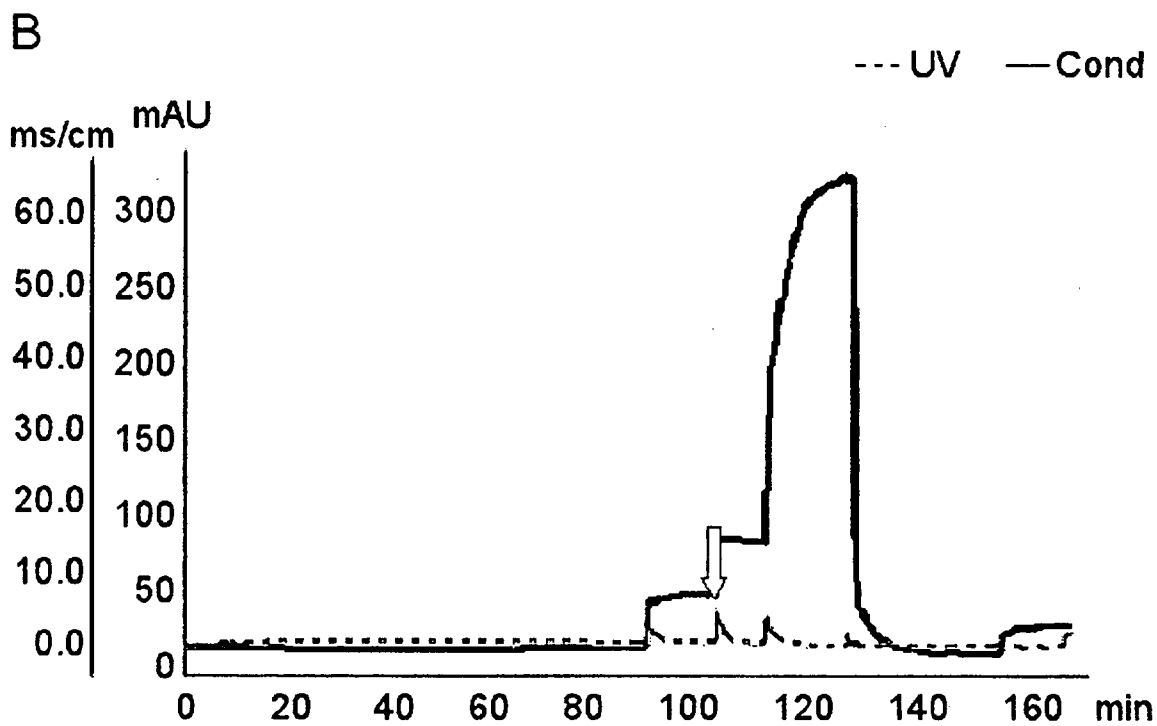
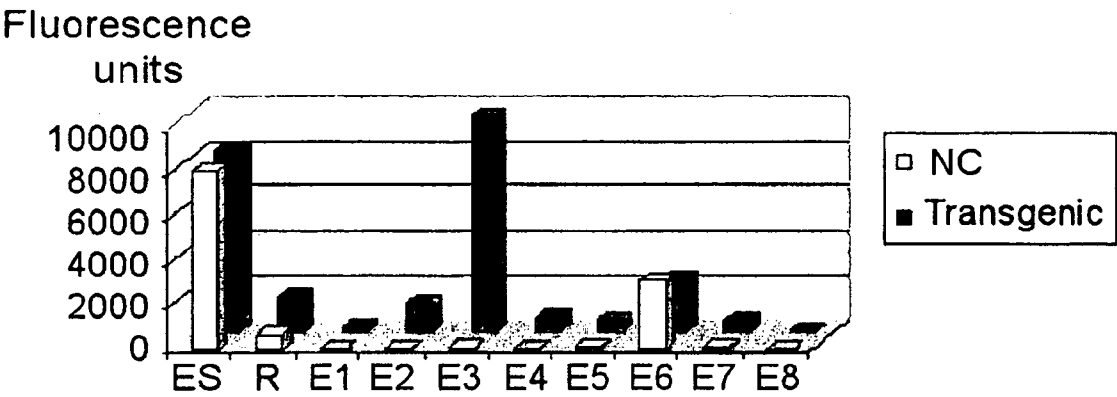


Fig. 6B

4/8



IEC chromatographic aliquots

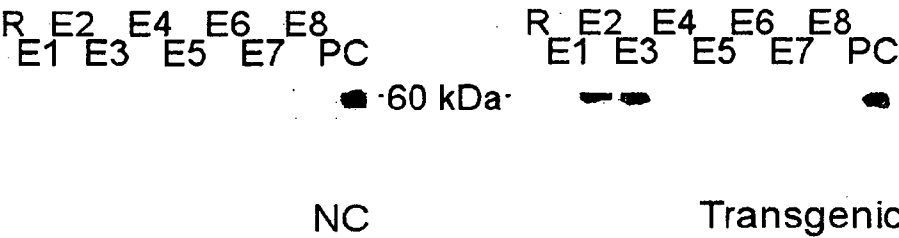


Fig. 7

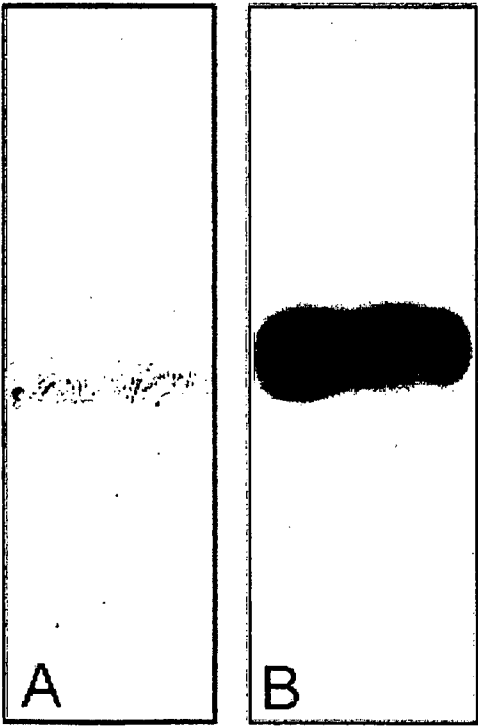


Fig. 8A

Fig. 8B

SS

WO 2009/112508

PCT/EP2009/052832

5/8

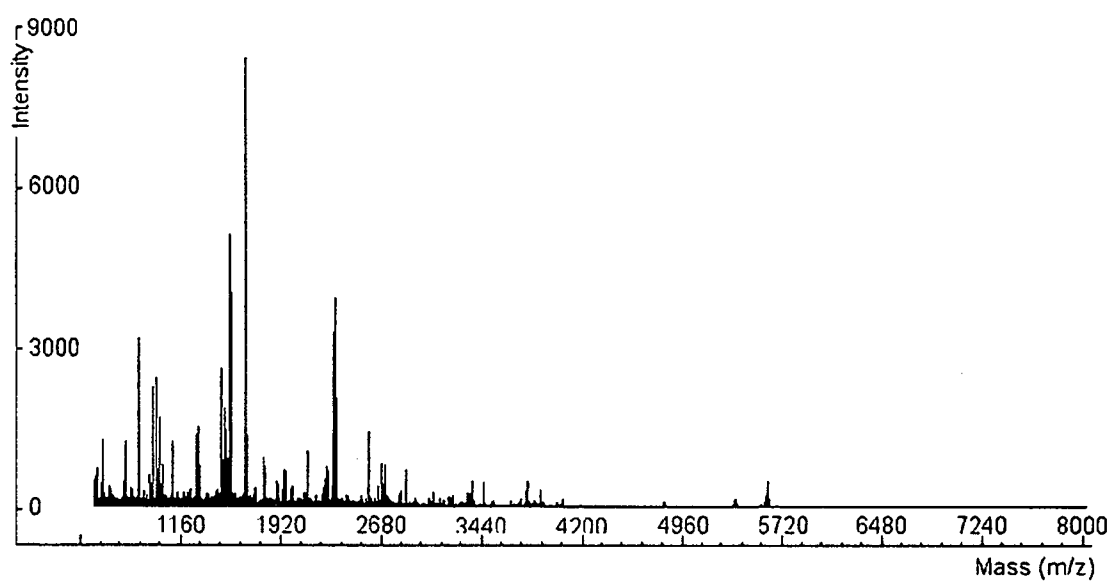


Fig. 9

6/8

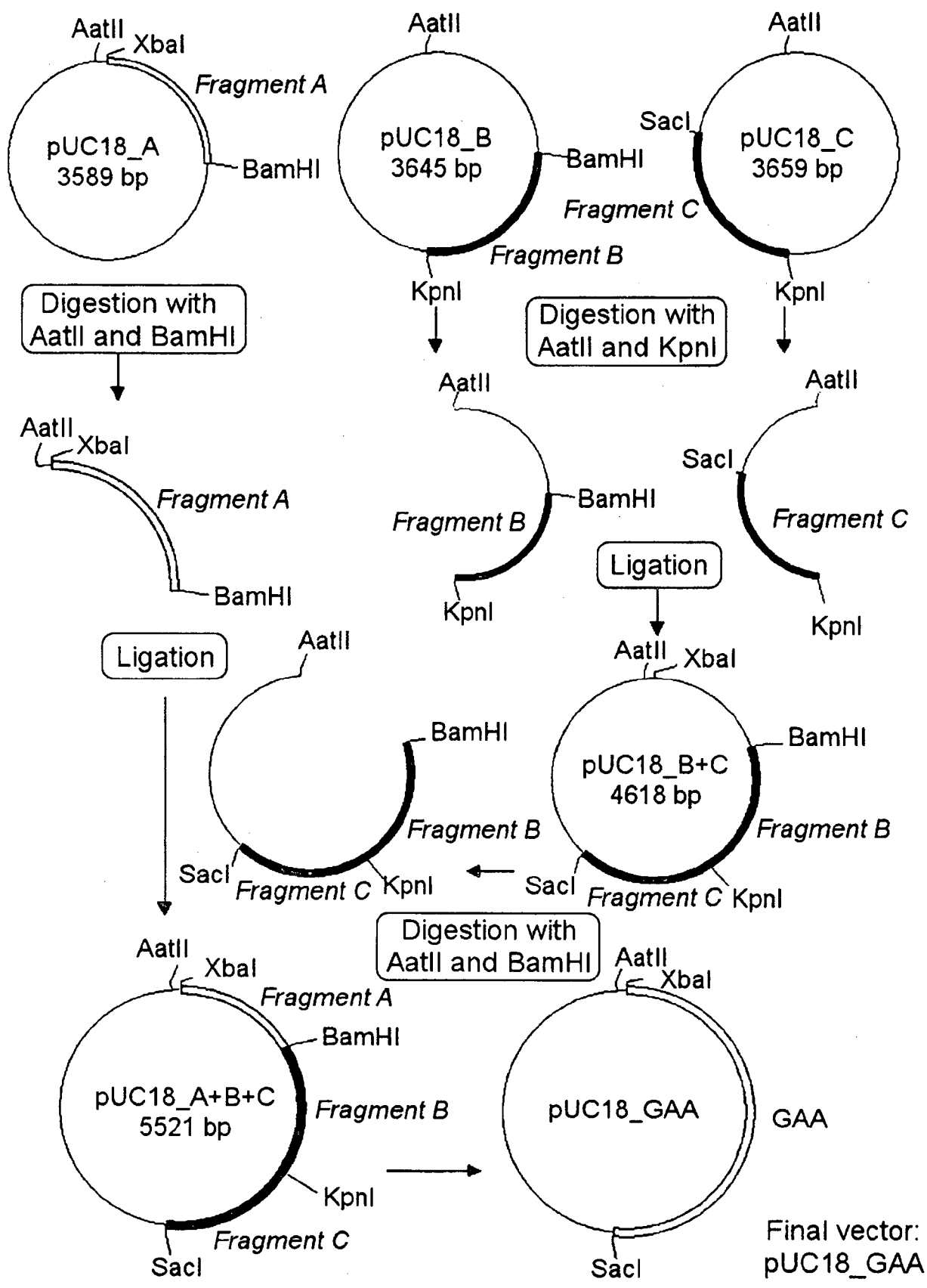


Fig. 10

7/8

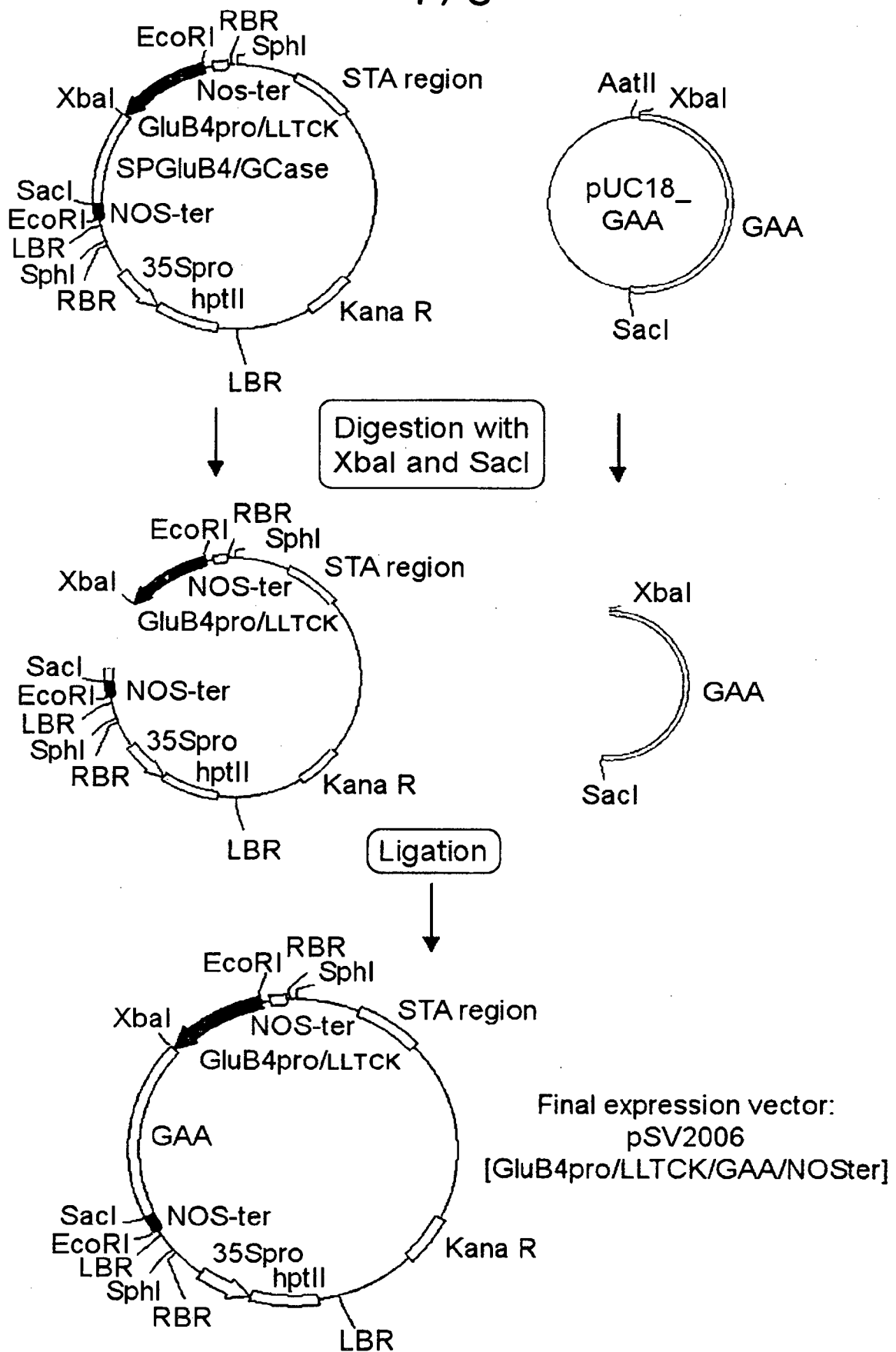


Fig. 11

8/8

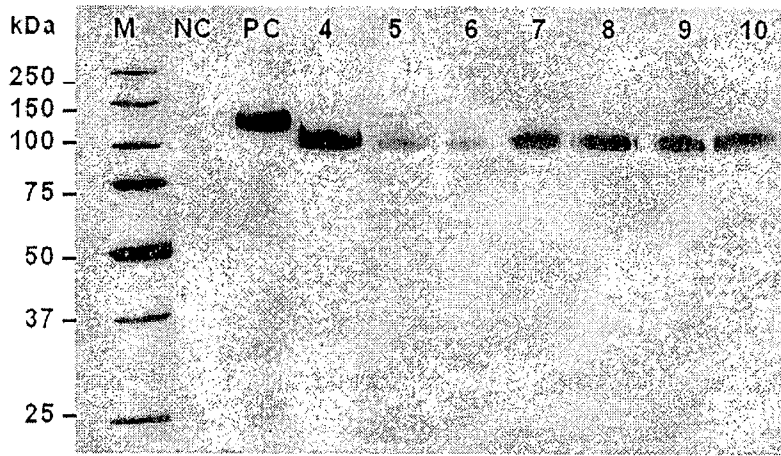


Fig. 12

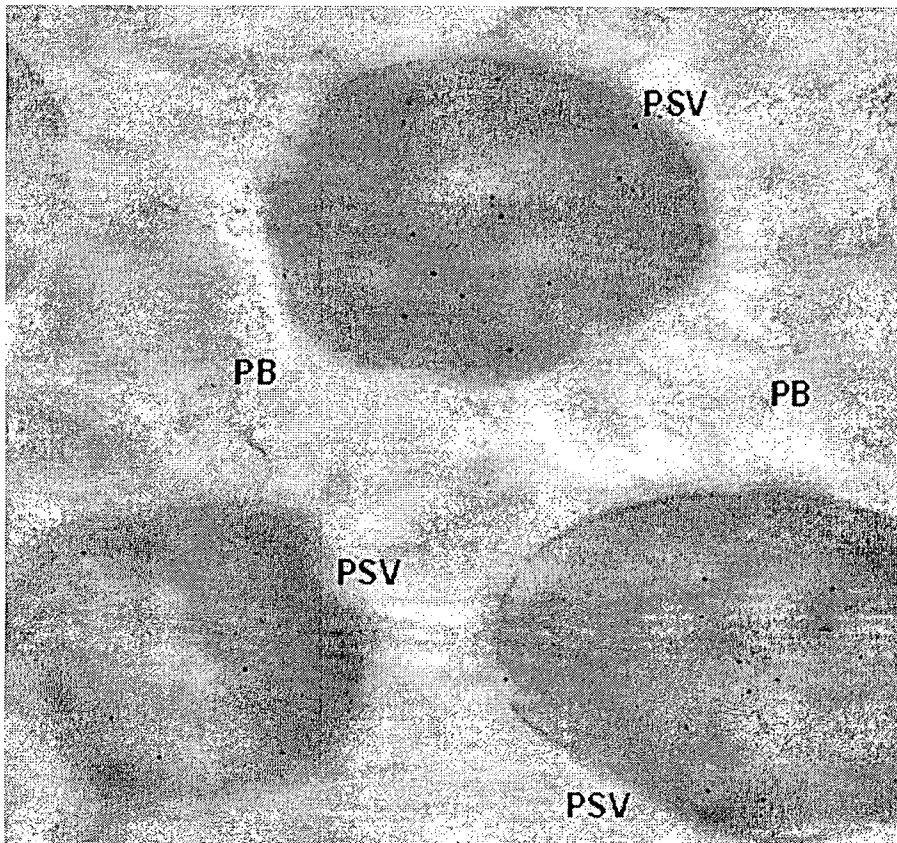


Fig. 13

59

UN MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN 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 una proteína humana, en particular una enzima lisosomal recombinante beta-glucosidasa ácida (E.C.3.2.1.45), 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.

Ellas 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 plantas genéticamente creadas podrían representar un sistema de producción alternativo para enzimas lisosomales, en particular para la beta-glucosidasa acida recombinada, desde ambos puntos de vista tecnológico y económico, puesto que las plantas de cultivo requieren relativamente materiales menos costosos y la infraestructura agrícola que ya existe en el territorio.

En WO-A-97/10353 (WO'353), la síntesis de enzimas lisosomales, comprenden beta-glucosidasa acida humana, es reportado exclusivamente en la hoja y, en particular en la hoja de especies de biomasa tales como el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). WO'353 describe un método problemático en el cual el contenido alto de agua de los tejidos de las hojas (significa una alta dispersión de la proteína de interés) y la presencia de un gran número de contaminantes proteínicos,

61

polifenoles, cauchos, exudados, alcaloides tóxicos, contribuyen a complicar el proceso de la extracción y purificación de la enzima.

Sin embargo, los fenómenos fitotóxicos, causado por la alteración del metabolismo de la planta normal, no se pueden excluir; estos fenómenos son particularmente relevantes puesto que ellos pueden ocurrir inesperadamente y no pueden solucionarse de una manera predecible.

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 las 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 Wo2'353 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 WO'839 se ha reportado que la producción de la enzima lisosomal en semilla es posible y que los niveles de expresión llevados a cabo con tal sistema son adecuados para su explotación industrial. Además, se ha declarado, puesto que las enzimas se acumulan en el apoplasto (precisamente un compartimiento extracelular caracterizado por un subacido pH), ellos pueden preservarse en una forma estable por bastante largo tiempo.

Sin embargo, WO'839 tampoco proporciona las enseñanzas para la producción de enzimas lisosomales, y en particular beta-glucosidasa acida, en plantas monocotiledóneas ni da información en como eludir, minimizar y vencer los problemas y las consecuentes limitaciones conectadas con la expresión de tejido y localización subcelular de tales enzimas, y en particular de beta-glucosidasa acida, en la semilla. De hecho, estos aspectos no son manejados en absoluto por ignorancia o negligencia.

64

Realmente, en WO'839 los ejemplos que tienen que ver con la construcción de vectores de expresión para la producción de enzimas lisosomales siempre reportan el uso de promotores de proteína de almacenamiento de plantas dicotiledóneas. Los ejemplos acerca de la expresión real de las enzimas lisosomales están limitados a una forma mutada de beta-glucosidasa acida y la planta huésped usada es siempre el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). 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 de enzimas lisosomales y, en particular, beta-glucosidasa acida.

Sin embargo, experimentos posteriores llevados a cabo en la semillas producidas por las plantas de tabaco transformadas usando el misma construcción citada en WO'839 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.

65

Una investigación de Solicitante 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. Se ha verificado, por la microscopía electrónica que el sitio de almacenamiento conseguido con la construcción WO'839 no corresponde realmente a lo que se espera en WO'839 (espacio apoplástico) excepto para las vacuolas proteínicas de almacenamiento internas para células parenquimáticas de embrión.

Similarmente para WO'839, la aplicación de la patente WO-A-00/04146 (WO'146), que describe la expresión de lactoferrina humana y de proteínas con una actividad enzimática genérica en la semilla de la planta, no proporciona alguna enseñanza acerca de la producción de las enzimas activas funcionalmente, al menos de todas las enzimas lisosomales.

En WO'146, no se proporciona evidencia para apoyar la efectividad del proceso de producción de enzima y los problemas relacionados con la estabilidad, conformación y funcionalidad de dichas enzimas son totalmente descuidados. 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 que puede llevarse a cabo a través de ellos. 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.

Un propósito del presente invento es llevar a cabo un proceso de producción de proteína humana en una planta, particularmente en una planta monocotiledónea, particularmente de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de cereal. El recientemente proceso ideado vence las dificultades propias de la situación técnicamente conocida, más específicamente:

67

- 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 facilita ambas la extracción proteínica y la purificación ;
- elimina el riesgo de fenómenos fitotoxicos;
- no afecta la viabilidad de la semilla;
- 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 proceso para la producción de una proteína humana en planta, en particular de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de planta, comprende:

- un primer paso de transformación de planta por el cual la proteína es obtenida y confinada en un endospermo que no es eventualmente absorbido por el embrión y por el cual la presencia de grandes cantidades de proteína en el endospermo no afecta negativamente la viabilidad de la semilla y la velocidad de germinación.
- el uso, en el primer paso de la transformación de planta, de un promotor de endospermo específico estimula el gen que codifica dicha proteína, y de un péptido señal para una transferencia co- traslacional de la reciente proteína sintetizada dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo para su acumulación de tejido específico;
- un segundo paso de la acumulación de proteína dentro del endospermo de semilla de una planta.

El presente invento permite la acumulación de proteína heteróloga en tejidos de almacenamiento no pertenecientes al embrión de la semilla. El presente invento también favorece la acumulación de una proteína 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.

69

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 aminoácido 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 planta el cual comprende una secuencia albergando los siguientes elementos:

- i) un promotor de endospermo específico de origen natural o artificial;

- ii) un 5' UTR de origen natural o artificial;
- iii) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial codificando un péptida señal adecuado para orientar la proteína recombinante dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y determinar la acumulación de dicha proteína en un tejido específico;
- iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial codificando la forma madura de la proteína humana;
- v) un 3' UTR de origen natural o artificial; y el uso de tal vector para la transformación de la planta.

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*.

Las plantas transformadas son preferiblemente cereales.

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

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

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 proteína 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 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 homólogo 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 beta-glucosidasa ácida humana, 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 proceso 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 convenientes para usarse para la transformación de la planta con el objetivo de expresar una proteína humana, en particular una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de la planta; dicha secuencia de nucleótidos comprende los siguientes elementos:

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

De acuerdo con una representación del presente invento, el promotor i) es el promotor glutelina 4 de arroz (GluB4pro), la secuencia del cual está indicada en 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 una representación adicional, la secuencia de nucleótidos del elemento iii) es la secuencia de PSGuB4, como se indica en SEQ ID N°:4, codificando el péptido señal usado por el arroz para orientar el precursor de glutelina 4 en el retículo endoplasmático.

De acuerdo con otra representación, 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 exterminador NOS, la secuencia de la cual se indica en SEQ ID N°: 6. Alternativamente el terminador del gen GluB4 puede usarse.

Típicamente, 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.

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 proteína humana en una planta, en particular de una enzima lisosomal humana en un endospermo de planta, albergando dicha secuencia de nucleótido. Típicamente, el vector de expresión molecular es un plásmido.

76

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 proteína, en particular 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.

77

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 proteína humana, en particular 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 proteína humana, en particular 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;

79

- 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 Kb (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);

80

- línea 2: control positivo (PC, 100 ng imiglucerasa); línea 3: control negativo (NC, extracto de proteínas de arroz no transformado, natural CR W3); líneas 4-10: extractos de proteínas de las semillas de diferentes transformantes primarios;
- La Figura 4B muestra tres glicoformas 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;

81

- 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 lo cual la proteína es obtenida y confinada en un endospermo, el cual no está eventualmente absorbido por el embrión, y la presencia de grandes cantidades de la proteína 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 proteína, y de un péptido señal para una transferencia co- translacional de la nueva proteína 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 proteína recombinante dentro del lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y para determinar la acumulación de dicha proteína en un tejido específico.
- iv) una secuencia de nucleótidos de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la proteína 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 proteína 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.

85

El promotor GluB4 fue aislado por el PCR del arroz de cera natural 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 extranjeros 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° MI6328, 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 Apicante 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 uso para la transformación de los callos embriogénicos de arroz (*Oriza sativa* ssp. Japonica, natural 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

87

transgénicas se encontró comparable con el observado en las plantas no transformadas del CR W3 natural. 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 aleatorio 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 florecencia) y se usaron para una extracción total de RNA. Posteriormente se realizaron los siguientes análisis: a. ausencia del ADN genómico contaminación

88

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 proteína 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

89

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 glicosilación. Diferentemente, el sitio primero, segundo, tercero y cuarto de N glicosilación 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 CR W3 innato 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;

91

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[GCcase], 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[Gccase] fueron digeridos con *Xba* I y *Hind* III para generar el eje central de inserto y vector,

93

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 ingenierada *Agrobacterium tumefaciens* fue usada para transformación de *Oryza sativa* ssp. *Japonica*, CR W3 innato.

Ejemplo 2: transformación del arroz vía *Agrobacterium tumefaciens*

94

La transformación del arroz se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo de Hiei (Hiei y otros, 1994), modificado por C. Hige (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 liquido (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 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 transferencia 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 transferencia 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

97

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 GCCase 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 (Reichter), colocadas en rejillas de

99

mallas 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).

100

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-glicosidasa 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 GCase

La actividad de GCase 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 GCase 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 GCase recombinante

La corrección de la secuencia N-terminal de GCase 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-glocisidasa 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 péptida 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)

105

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 vector 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 GCCase 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 GCCase dentro de pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGLuB4/GCCase/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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 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 una proteína humana en una planta, en particular una enzima lisosomal humana recombinante 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 una proteína humana en una planta, en particular una enzima lisosomal humana recombinante 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.

SOLICITUDES

1. Método para la producción de una proteína humana en planta, en particular de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de planta, caracterizado en que este comprende:
 - un primer paso de transformación de planta por lo que la proteína es obtenida y confinada en un endospermo, el cual no es eventualmente absorbido por el embrión, y al presencia de grandes cantidades de proteína en el endospermo no afecta de manera negativa la viabilidad de la semilla y velocidad de la germinación;
 - el uso, en el primer paso de la transformación de planta, de un promotor específico de endospermo impulsa la codificación de gen dicha proteína, y de péptido señal para una transferencia co-traslacional de una nueva proteína sintetizada en un lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo para su acumulación de tejido específico;
 - un segundo paso de acumulación de proteína dentro del endospermo se semillas de una planta.
2. Método como en la solicitud 1, caracterizado por la acumulación de proteína dentro de vacuolas de almacenamiento de proteínas de endospermo (PSVs) o cuerpos de proteína (PBs).

3. Método con en la solicitud 1 o 2, caracterizado por la construcción de un vector de expresión de planta para la transformación de tales plantas, que contiene una secuencia de nucleótido que alberga los siguientes elementos:

- i) un promotor de endospermo específico de origen natural o artificial;
- ii) un UTR 5' de origen natural o artificial;
- iii) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifique un péptido señal apropiado para orientar la proteína recombinante en el lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y para determinar la acumulación de dicha proteína en un tejido específico;
- iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la proteína humana;
- v) un UTR 3' de origen natural o artificial;

y donde el vector desarrollado en esta forma para transformación de planta es usado.

4. Método como en la solicitud 3 o 4, caracterizado en que la secuencia de nucleótido del vector de expresión es como se indica en SEQ ID No: 1.

5. Método como en la solicitud 3 o 4, caracterizado en que el vector de expresión es introducido en cepas bacteriales, las cuales son, directa o indirectamente, usados para transformación de planta.

6. Método como en la solicitud 5, caracterizado en que la cepa bacterial elegida pertenece a un grupo que comprende *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.
7. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que las plantas transformadas son cereales.
8. Método como en las solicitudes 5 y 7 o 6 y 7, caracterizado en que la cepa bacterial es usada para la transformación del callo embriogénico de arroz (*Oryza sativa ssp. Japonica*, CR W3 innato).
9. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa ácido humano.
10. Método como en cualquiera de las solicitudes desde 1 a 8, caracterizado en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa ácido humano.
11. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que este comprende un tercer paso de fabricación industrial de semilla de planta.
12. Método como en la solicitud 11, 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.

13. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado por un cuarto paso de purificación de la proteína recombinante.
14. Método como en la solicitud 13, caracterizado en que el paso de purificación incluye una cromatografía de interacción hidrofóbica, una cromatografía de intercambio iónico y una filtración de gel.
15. Método como en la solicitud 13 o 14, 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.
16. Secuencia de nucleótido apropiada en la transformación de planta de la expresión de una proteína humana, en particular de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de planta, caracterizado en que este incluye los siguientes elementos:
 - i) un promotor de endospermo específico de origen natural o artificial;
 - ii) un UTR 5' o origen natural o artificial;
 - iii) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifica un péptido señal para orientar la proteína recombinante en el lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo para su acumulación subsecuente en un tejido específico;
 - iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la proteína humana;

v) un UTR 3' de origen natural o artificial.

17. Secuencia como en la solicitud 16, caracterizada en que el i) es el promotor de glutelina 4 de arroz (GluB4pro).

18. Secuencia como en la solicitud 16 o 17, donde la ii) región UTR 5' es líder conocido como LLTCK.

19. Secuencia como en la solicitud 16, 17 o 18, caracterizado en que la secuencia de nucleótido de el iii) elemento es la secuencia PSGLuB4 que codifica un péptida señal usada en arroz para orientar el precursor de glutelina 4 dentro del retículo endoplasmático.

20. Secuencia como en cualquiera de las solicitudes desde 16 hasta 19, caracterizada en que la secuencia de nucleótido del iv) elemento es la secuencia GCase que codifica la forma madura de beta-glucosidasa acida humana.

21. Secuencia como en cualquiera de la solicitudes desde 16 a 20, caracterizado en que el UTR 3' del v) elemento es el terminador NOS o el terminador del gen GluB4.

22. Secuencia de nucleótido como en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 21, como se indica en SEQ ID No: 1.

23. Secuencia complementaria a la secuencia de nucleótido como se reporta en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 22.
24. Secuencia que deriva de eventos de mutación, como supresiones, inserciones, subtracciones de uno o más nucleótidos en secuencias como en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 22, o sus secuencias complementarias como en la solicitud 23.
25. Combinación de secuencias de nucleótidos como en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 22 que codifica la forma madura de beta-glucosidasa con elementos, como promotores, secuencias para orientación para el retículo endoplasmático y regiones 5' y 3' no traducidas, diferentes de aquellas reportadas en SEQ ID No: 1, apropiada para obtener la síntesis de enzima y almacenar específicamente en el endospermo de semilla o con secuencias de nucleótido complementarias a tales secuencias.
26. Combinación de elementos i), ii), iii), iv) y v) como en la solicitud 16 con secuencias que codifican la enzima madura que difiere de esa reportada en SEQ ID No. 1 debido a la presencia de mutaciones sinónimas o polimorfismos dentro de especies humanas o combinaciones producidas con secuencias de nucleótidos complementarias a tales secuencias.
27. Combinación de elementos de secuencias de nucleótidos i), ii), iii), iv) y v) como en las solicitud 16 con secuencias que codifican formas maduras o precursores de otras enzimas lisosomales, o combinaciones producidas con secuencias de nucleótidos complementarias a tales secuencias.

28. Combinación como en la solicitud 27, en la cual la enzima es el alfa-glucosidasa acido humano.
29. Secuencia como en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 28, caracterizada en que las plantas transformadas son cereales.
30. Vector molecular para la expresión de una proteína humana en una planta, en particular de una enzima lisosomal recombinante humana en un endospermo de planta, que incluye la secuencia de nucleótido como en cualquiera de las solicitudes desde 16 a 29.
31. Vector como en la solicitud 30, caracterizada en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa acido humano.
32. Vector como en la solicitud 30, caracterizada en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa acido humano.
33. Vector como en las solicitudes 30, 31 o 32, caracterizado en que dicho vector es un plásmido.
34. Uso del vector del expresión como en cualquiera de las solicitudes desde 30 a 33 para la transformación de una planta para la producción de una proteína, en particular de una enzima lisosomal humana.

35. Cepas bacteriales que albergan vectores como en cualquiera de las solicitudes desde 30 a 33.
36. Cepas bacteriales como en la solicitud 35, escogidas en un grupo que comprenden las especies *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.
37. Células de plantas transformadas con un vector de expresión como en cualquiera de las solicitudes desde 30 a 33.
38. Células como en la solicitud 37, caracterizadas en que dichas células son células de cereal.
39. Células como en la solicitud 38 que pertenecen a especies de arroz cultivadas (*Oryza sativa* L.).
40. Células como en la solicitud 39 que pertenecen a la familia *Graminaceae* (*Poaceae*) como por ejemplo maíz (*Zea mays* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum* spp.).
41. Semilla de la planta transformada para la expresión de una proteína humana, en particular de una enzima lisosomal humana, caracterizada en que esta contiene un casete de expresión derivada de un vector como en cualquiera de las solicitudes desde 30 a 33.

42. Semilla como en la solicitud 41, caracterizada en que las plantas transformadas pertenecen a cereales.
43. Semilla como en la solicitud 41 o 42, caracterizada en que la planta transformada pertenece a especies de arroz cultivadas (*Oryza sativa* L.).
44. Planta transformada por la expresión de una proteína humana, en particular de una enzima lisosomal humana, caracterizada en que esta transformada por un vector de expresión como en cualquiera de las solicitudes desde 30 a 33.
45. Planta transformada como en la solicitud 44, caracterizada en que esta es un cereal.
46. Planta transformada como en las solicitudes 44 y 45 que pertenecen a las especies de arroz cultivadas (*Oryza sativa* L.).
47. Progenies obtenidas por auto-fertilización, cruce natural o artificial, o líneas transformadas seleccionadas de una planta transformada como en las solicitudes 44, 45 o 46.
48. Semilla como en las solicitudes 41, 42 o 43 para uso terapéutico.
49. Uso de la semilla como en las solicitudes 41, 42 o 43 para la producción de una droga para terapia de reemplazo de enzima.

50. Uso de la semilla como en la solicitud 49 para la producción de una medicina para la terapia de reemplazo de enzima de las siguientes enfermedades: enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick B, mucopolisacaridosis I, II, IV.
51. Semilla como en las solicitudes 41, 42 o 43 para uso en terapia de reemplazo de enzima.
52. Semilla como en la solicitud 51 para uso en terapia de reemplazo de enzima de las siguientes enfermedades: enfermedad de Gaucher, Glucogenosis tipo II, enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick B, mucopolisacaridosis I, II, IV.
53. Método para la producción de una proteína humana en una planta, en particular de una enzima lisosomal recombinante humana en un endospermo de cereal, como se describió arriba, con referencia a las figuras anexas.

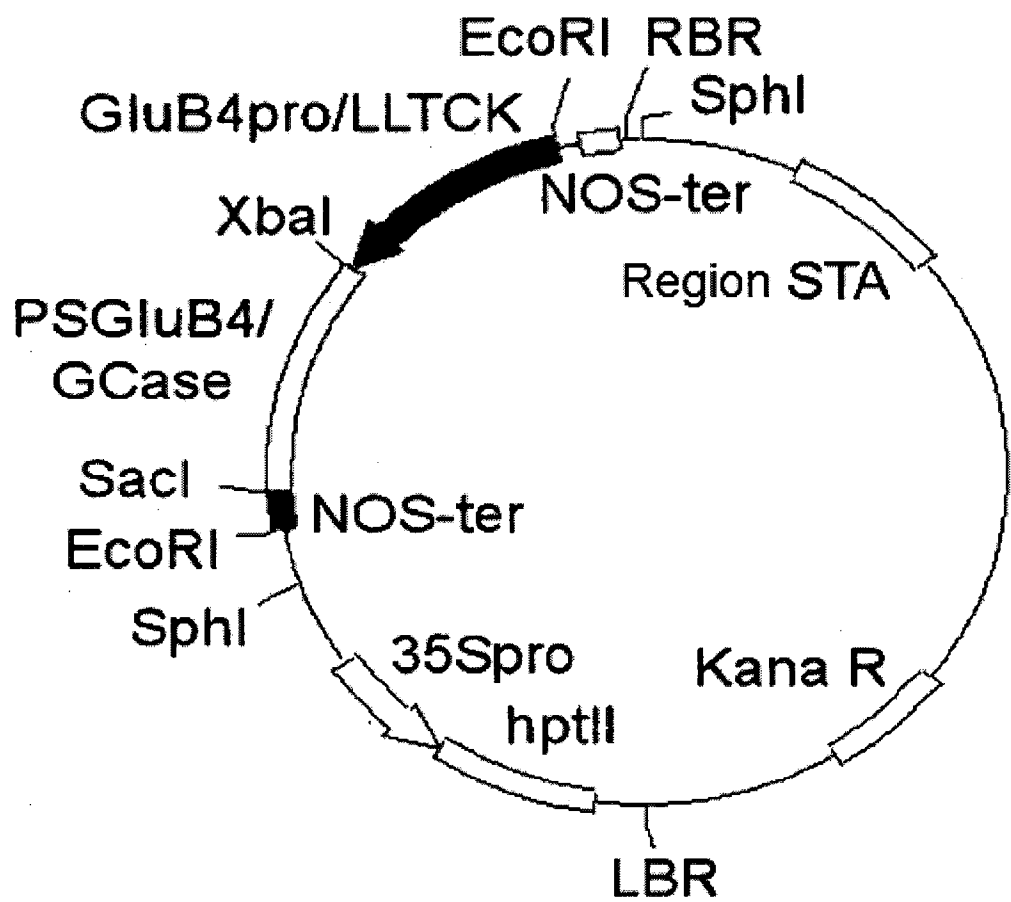


Figura 1

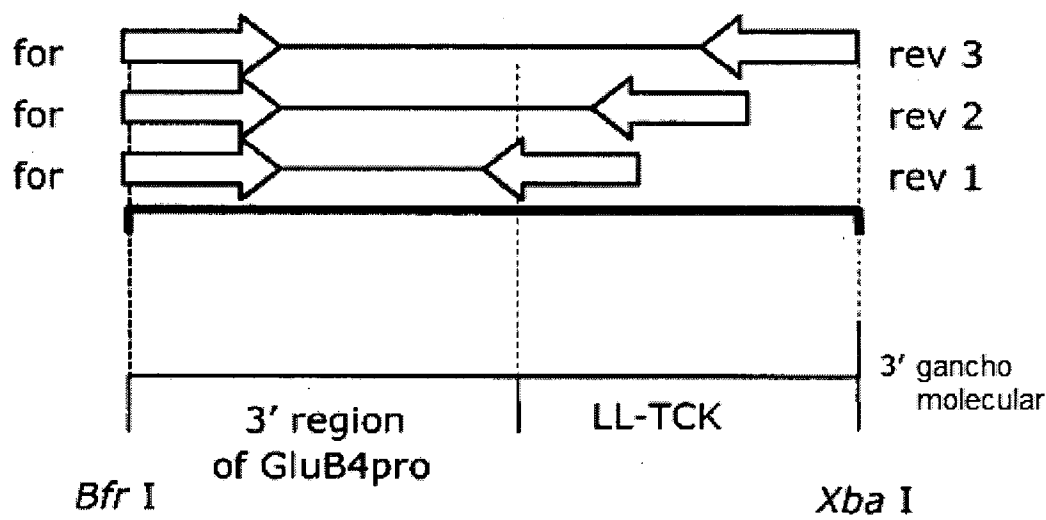


Figura 2^a

123

2/8

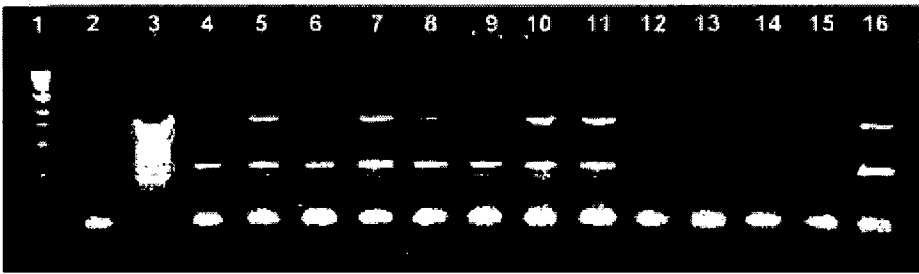


Figura 2B

A 1 2 3 4 5 6 7

B

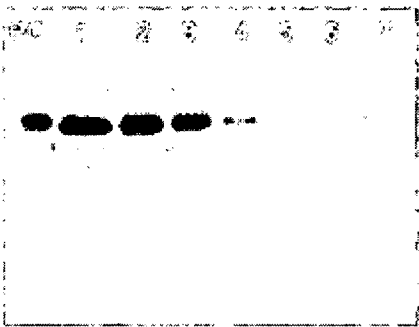
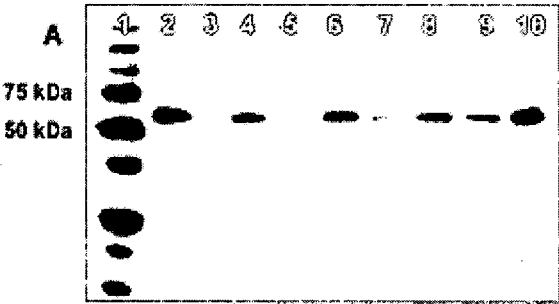


Figura 3A

Figura 3B



B

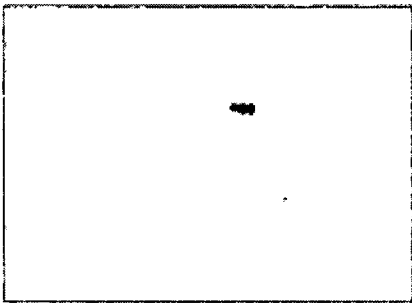


Figura 4A

Figura 4B

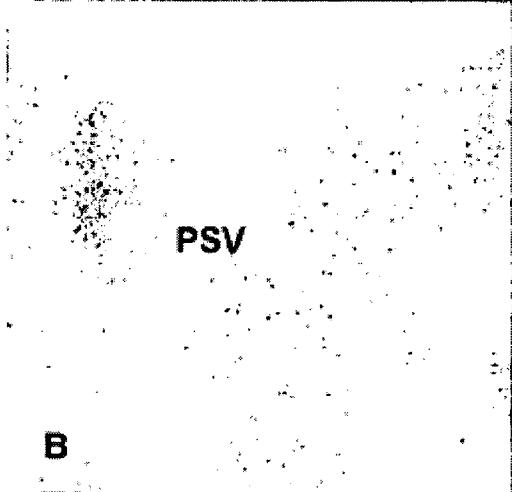
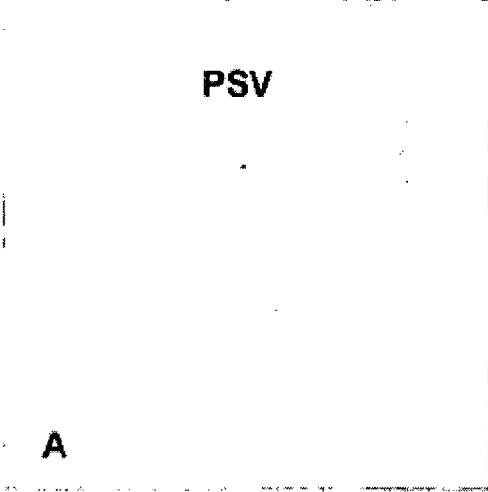


Figura 5A

Figura 5B

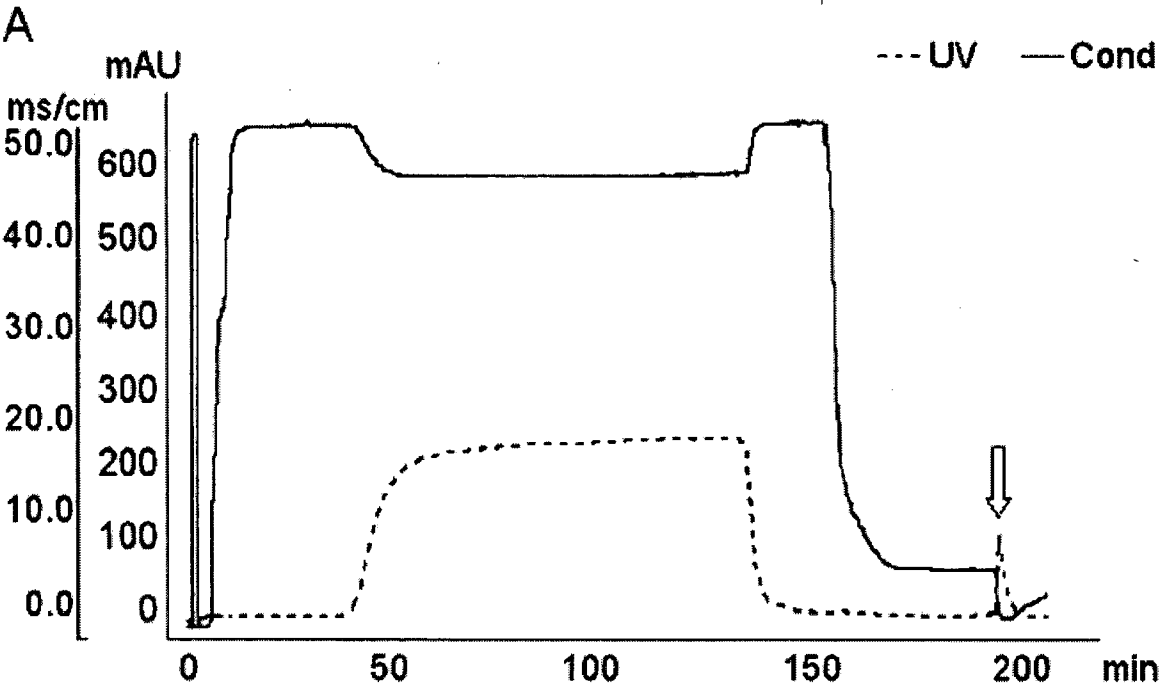


Figura 6A

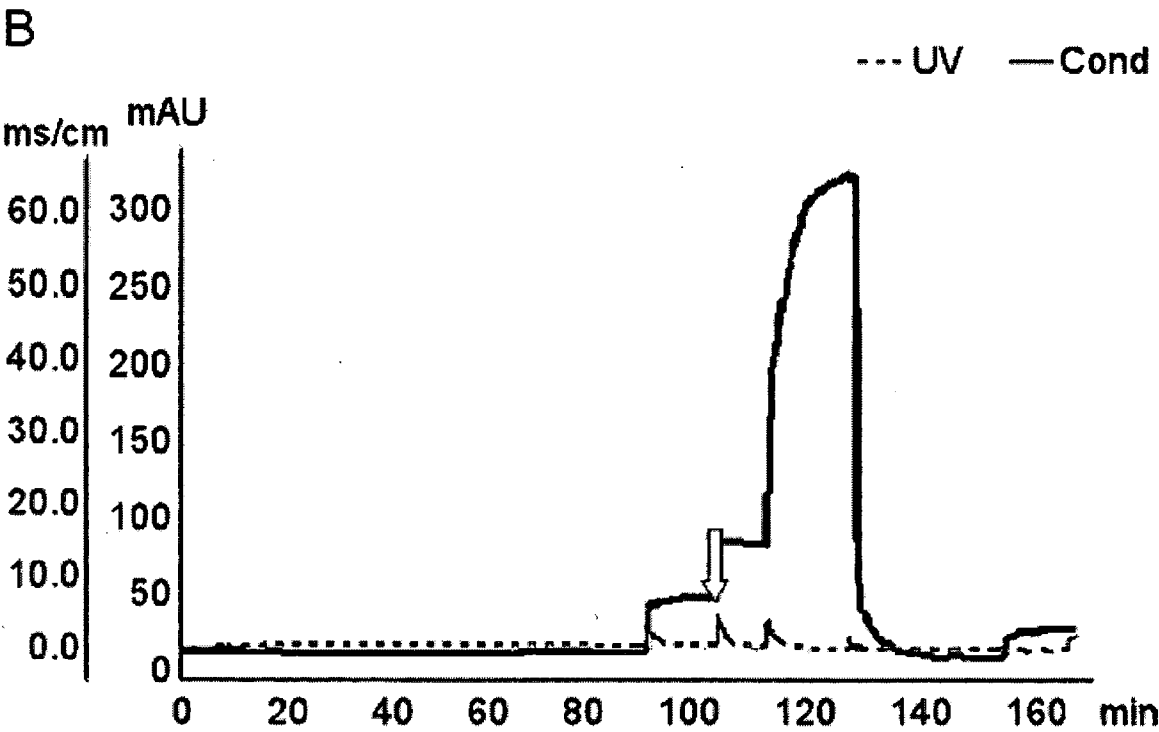
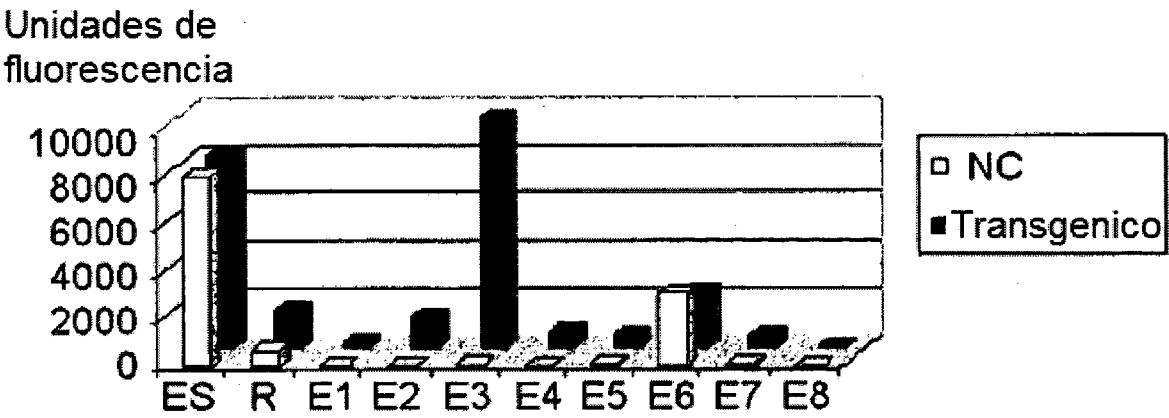


Figura 6B

125



Alícuotas cromatográficas IEC



NC Figura 7

Transgenico

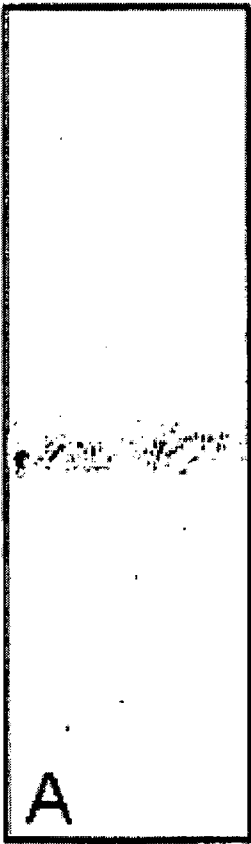


Figura 8A

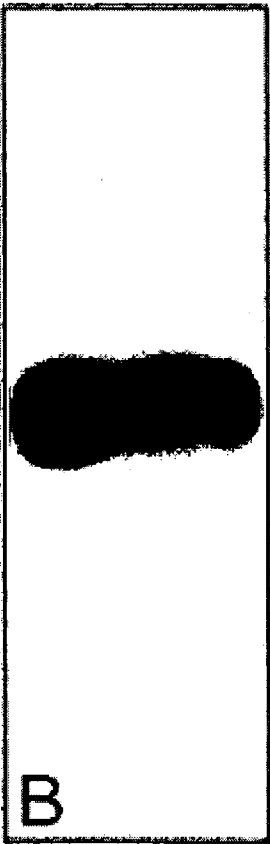


Figura 8B

5/8

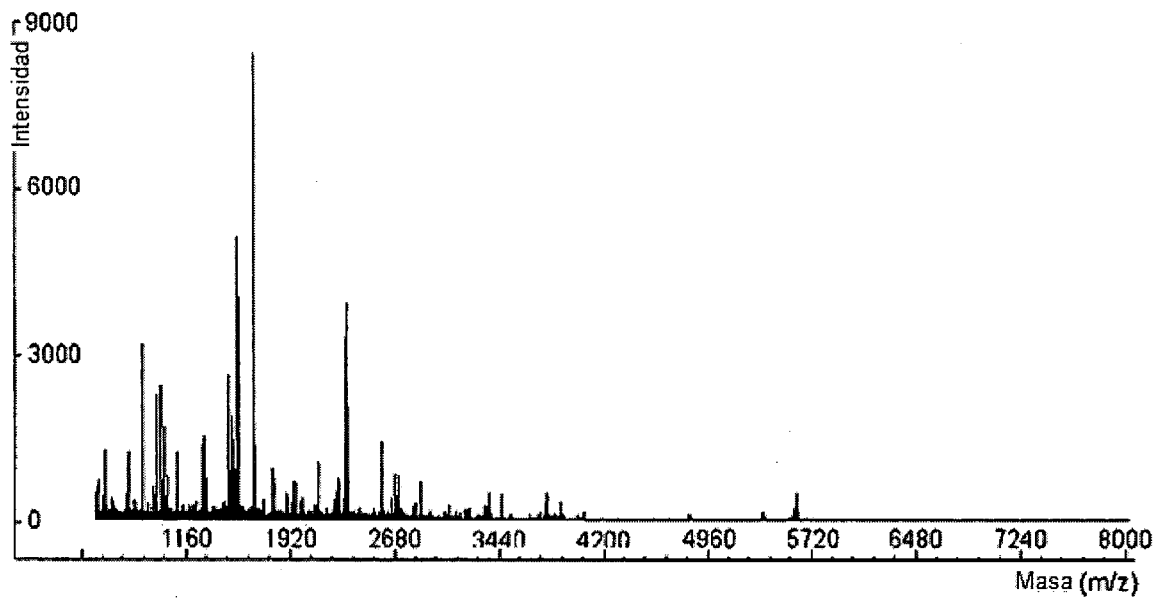


Figura 9

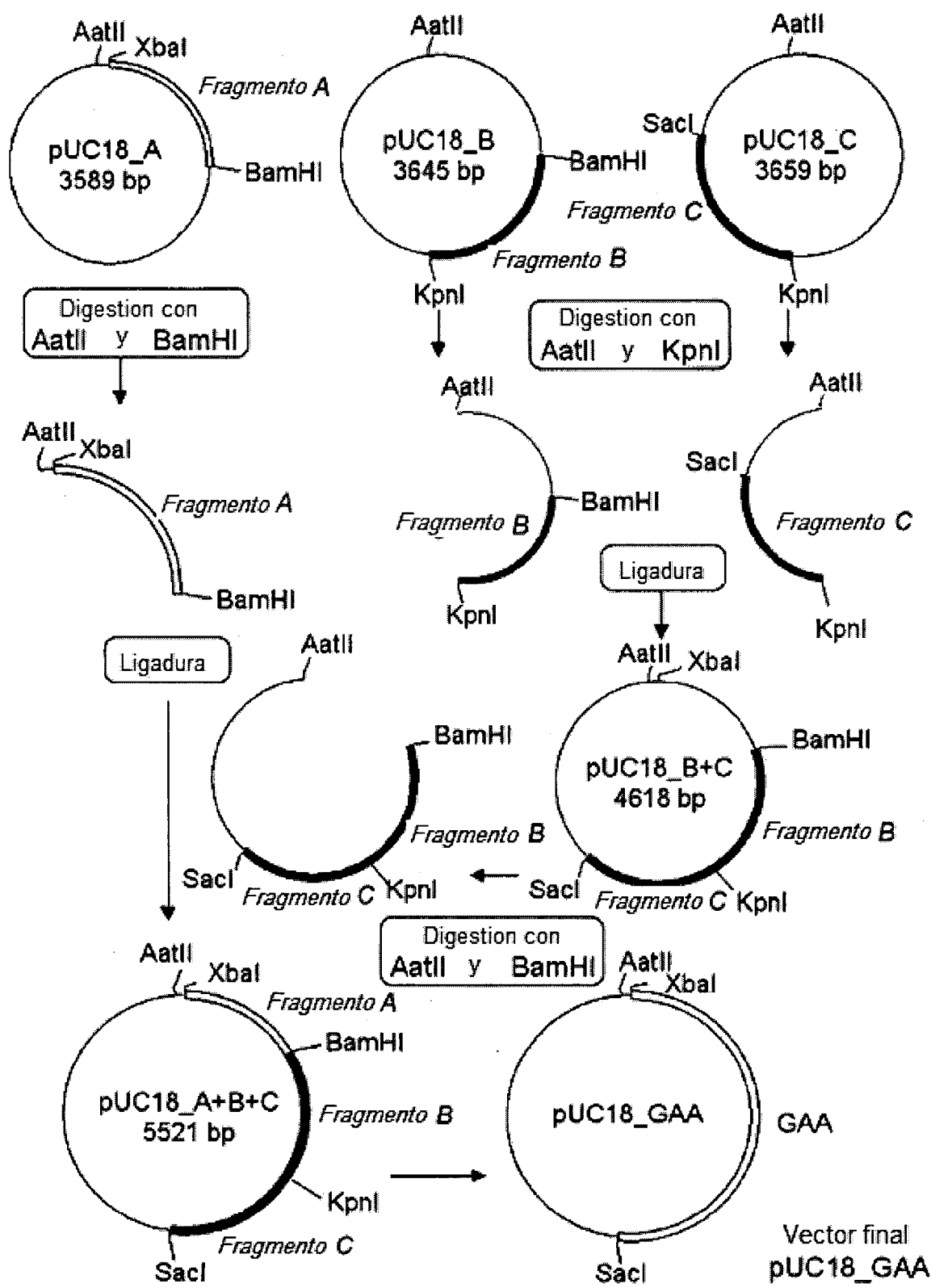


Figura 10

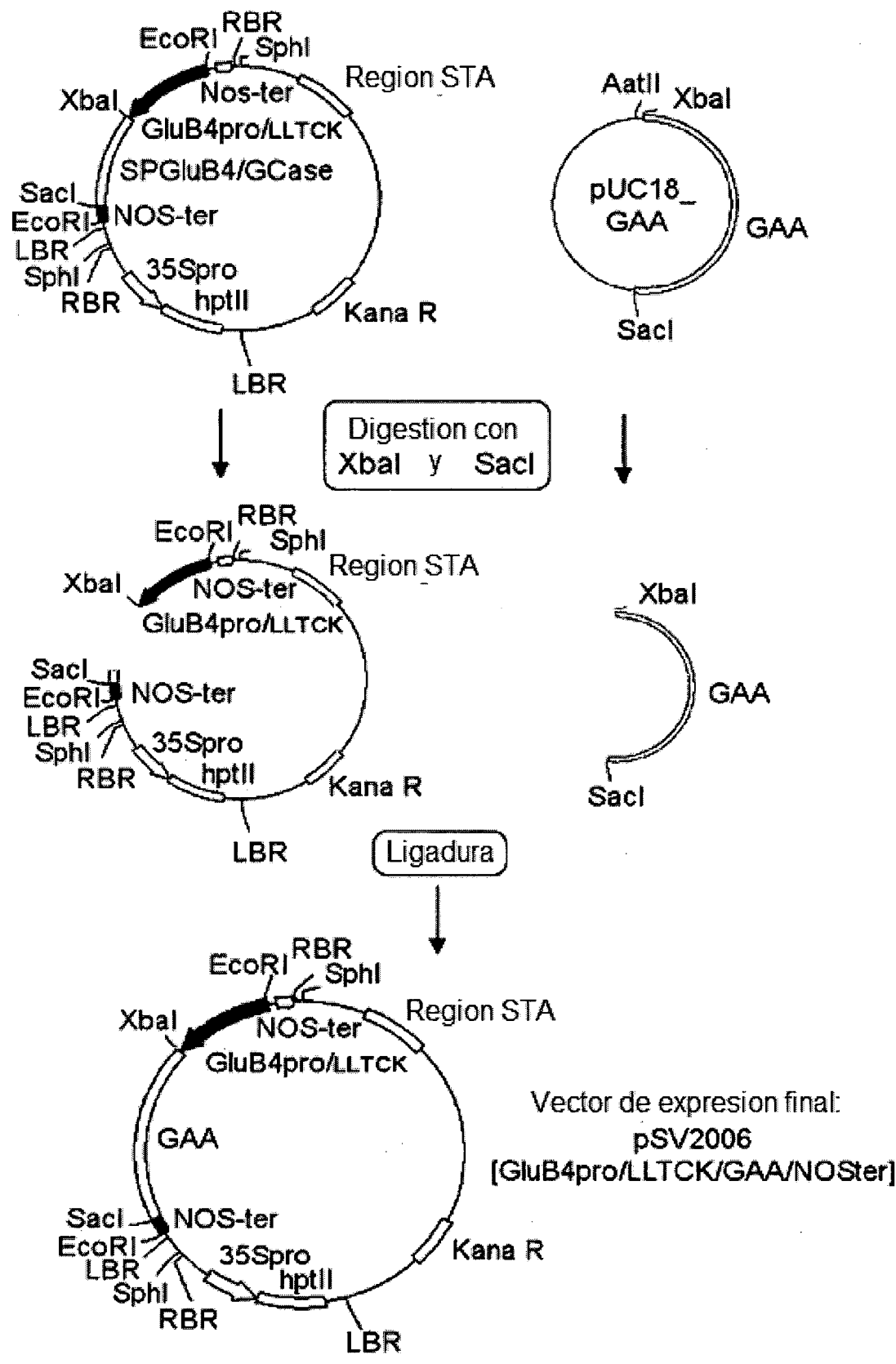


Figura 11

8/8

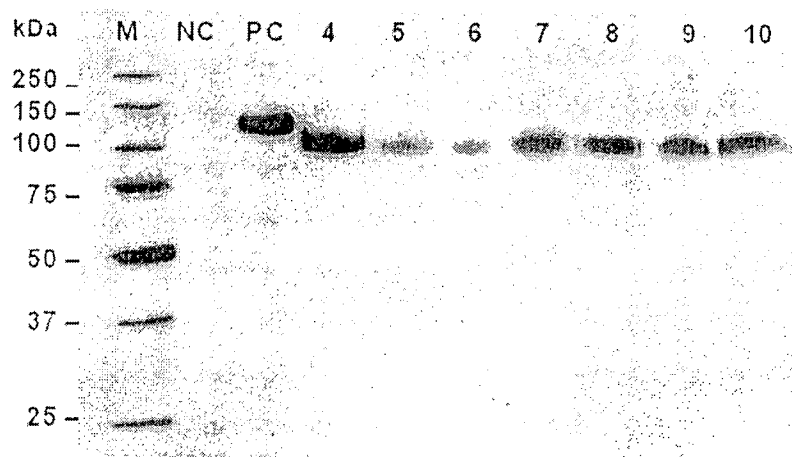


Fig. 12

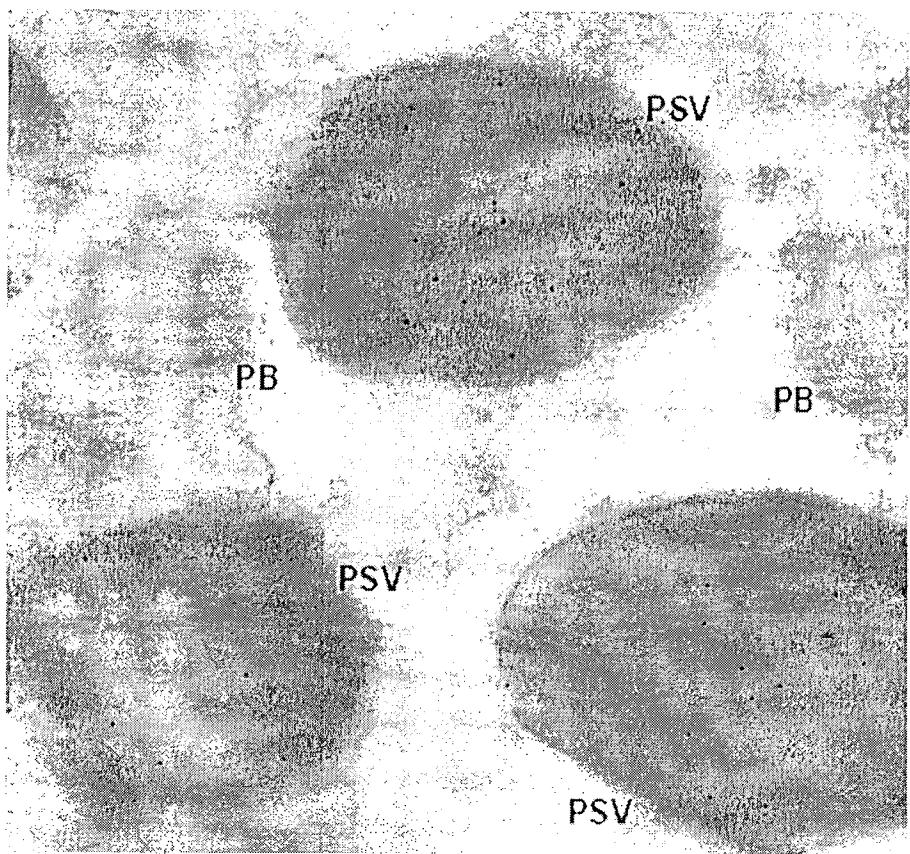


Fig. 13

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Transactiva S.r.l.
- <120> Un método para la producción de enzimas lisosomales recombinantes humanas en un endospermo de cereal
- <130> V3-4707
- <150> UD2008A000055
- <151> 2008-03-13
- <160> 9
- <170> Versión de patentIn 3.3
- <210> 1
- <211> 3357
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Casete de expresión
- <400> 1

gaattctaca	gggttccttg	cgtgaagaag	ggtggcctgc	ggttcaccat	taacgggtcac	60
gactacttcc	agctagtact	ggtgaccaac	gtcgcggcgg	caggggtcaat	caagtccatg	120
gaggttatgg	gttccaacac	agcggattgg	atgccgatgg	cacgtaactg	gggcgcccaa	180
tggcactcac	tggcctacct	caccggtcaa	ggtctatcct	ttaggggtcac	caacacagat	240
gaccaaacgc	tcgtcttcac	caacgtcgtg	ccaccaggat	ggaagtttgg	ccagacattt	300

gcaagcaagc tgcagttcaa gtgagaggag aagcctgaat tgataccgga gcgtttcttt 360
tgggagtaac atctctgggt gcctagcaaa catatgattg tatataagtt tcgttgtgcg 420
tttattcttt cgggtgtgtaa aataacatac atgttttct gatattttct tgtatatatg 480
tacacacaca cgacaaatcc ttccatttct attattattg aacaatttaa ttgcgagggc 540
gagtacttgt ctgtttacct ttttttttc agatggcatt ttatagttaa acctttcatg 600
gaccggcagt agttctaacc atgaatgaaa agaaatcata gtccacacca cgcagggaca 660
ttgtggcat tttagacaag acgatttgat taatgtcttg tatgatatgg tcgacagtga 720
ggactaacaac acatatggca tattttatta cgggcgagtt aaataaattt atgtcacagt 780
aataaactgc ctaataaatg cacgccagaa aatataatga taaaaaaaaag aaaagataca 840
taagtccatt gcttctactt ttttaaaaat taaatccaac attttctatt ttttggtata 900
aacttgaag tactagtgg atatgcaaaa tcatctaacc tccatatatt tcatcaattt 960
gtttacttta catatgggag aggatagtat gtcaaagaaa atgacaacaa gcttacaagt 1020
ttcttatttt aaaagttccg ctaacttacc aagcatagtg tgccacgcaa aactgacaac 1080
aaaccaacaa atttaaggag cgctaactt atcatctatg acataccgca caaatgata 1140
acatactaga gaaactttat tgcacaaaag gaaatttacc cataaggcaa aggaacatct 1200
taaggctttg gatatacatt taccaacaag cattgtttgt attacccta aagcgcaaga 1260
catgtcatcc atgagtcata gtgtgtatat ctcaacattg caaagctacc tttttctat 1320
tatacttttc gcattatagg ctagatatta tctatacatg tcaacaaact ctatccctac 1380
gtcatatctg aagattcttt tcttactat ataagttggc ttccctgtca ttgaactcac 1440
atcaaccagc ccaacacgta ttttacaac aataccaaca acaacaacaa caaacaacat 1500
tacaattacg tatttctctc tctagaatgg ccaccattgc gttctccgg ctgtccatct 1560
acttctgcgt gctgctgctg tgccacggct ccatggccgc ccgcccctgc atccctaaaa 1620
gcttcggcta cagctcgggt gtgtgtgtct gcaatgccac atactgtgac tctttgacc 1680
ccccgacctt tctgcccctt ggtaccttca gccgctatga gactacacgc agtgggagac 1740
ggatggagct gagtatgggg ccatccagg ctaatcacac gggcacaggc ctgctactga 1800
ccctgcagcc agaacagaag ttccagaaag tgaagggatt tggaggggcc atgacagatg 1860
ctgctgctct caacatcctt gccctgtcac cccctgcca aaatttgcta cttaaactgt 1920
acttctctga agaaggaatc ggatataaca tcatccgggt acccatggcc agctgtgact 1980

tctccatccg cacctacacc tatgcagaca cccctgatga tttccagttg cacaacttca	2040
gcctcccaga ggaagatacc aagctcaaga taccctgat tcaccgagcc ctgcagttgg	2100
cccagcgtcc cgtttcactc cttgccagcc cctggacatc acccacttgg ctcaagacca	2160
atggagcggg gaatgggaag gggtcactca agggacagcc cggagacatc taccaccaga	2220
cctggggccag atacttttg aagttcctgg atgcctatgc tgagcacaag ttacagttct	2280
gggcagtgac agctgaaaat gagccttctg ctgggctgtt gagtggatac cccttccagt	2340
gcctgggctt caccctgaa catcagcgag acttcattgc ccgtgacctt ggtcctaccc	2400
tcgccaacag tactcaccac aatgtccgcc tactcatgct ggatgaccaa cgcttgctgc	2460
tgccccactg ggcaaagggt gtactgacag acccagaagc agctaaatat gttcatggca	2520
ttgctgtaca ttggtacctg gactttctgg ctccagccaa agccacccta ggggagacac	2580
accgcctgtt cccaacacc atgctctttg cctcagaggc ctgtgtgggc tccaagttct	2640
gggagcagag tgtgcggcta ggctcctggg atcgagggat gcagtacagc cacagcatca	2700
tcacgaacct cctgtacat gtggtcggct ggaccgactg gaaccttgcc ctgaaccccg	2760
aaggaggacc caattgggtg cgtaactttg tcgacagtcc catcattgta gacatcacca	2820
aggacacgtt ttacaaacag cccatgttct accaccttgg ccacttcagc aagttcattc	2880
ctgagggctc ccagagagtg gggctggttg ccagtcagaa gaacgacctg gacgcagtgg	2940
cactgatgca tcccgatggc tctgctgttg tggctgtgct aaaccgctcc tctaaggatg	3000
tgctcttac catcaaggat cctgctgttg gcttcttga gacaatctca cctggctact	3060
ccattcacac ctacctgttg catcgccagt gagagctcga tcgttcaaac atttggaat	3120
aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata taatttctgt	3180
tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg	3240
ttttatgat tagagtcccg caattataca ttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc	3300
gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat cgaattc	3357

<210> 2

<211> 1448

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 2

tacaggggtc	ctgcgtgaa	gaaggggtggc	ctgcgggtca	ccattaacgg	tcacgactac	60
ttccagctag	tactggtgac	caacgtcgcg	gcggcaggggt	caatcaagtc	catggaggtt	120
atggggtcca	acacagcgga	ttggatgccg	atggcacgta	actggggcgc	ccaatggcac	180
tcactggcct	acctcaccgg	tcaaggtcta	tcctttaggg	tcaccaacac	agatgaccaa	240
acgctcgtct	tcaccaacgt	cgtgccacca	ggatggaagt	ttggccagac	atttgcaagc	300
aagctgcagt	tcaagtgaga	ggagaagcct	gaattgatac	cggagcgttt	cttttgggag	360
taacatctct	ggttgcctag	caaacatatg	attgtatata	agtttcgttg	tgcgtttatt	420
ctttcggtgt	gtaaaataac	atacatgctt	tcctgatatt	ttcttgata	tatgtacaca	480
cacacgacaa	atccttccat	ttctattatt	attgaacaat	ttaattgcga	gggcgagtac	540
ttgtctgttt	acctttttt	tttcagatgg	cattttatag	tttaaccttt	catggaccgg	600
cagtagttct	aacctatgaat	gaaaagaaat	catagtccac	accacgcagg	gacattgtgg	660
tcattttaga	caagacgatt	tgattaatgt	cttgtatgat	atggtcgaca	gtgaggacta	720
acaaacatat	ggcatatttt	attaccggcg	agttaaataa	atttatgtca	cagtaataaa	780
ctgcctaata	aatgcacgcc	agaaaatata	atgataaaaa	aaagaaaaga	tacataagtc	840
cattgcttct	acttttttaa	aaattaaatc	caacattttc	tattttttgg	tataaacttg	900
gaagtactag	ttggatatgc	aaaatcatct	aacctccata	tatttcatca	attgttttac	960
tttacatatg	ggagaggata	gtatgtcaaa	gaaatgaca	acaagcttac	aagtttctta	1020
ttttaaaggt	tccgctaact	tatcaagcat	agtgtgccac	gcaaaaactga	caacaaacca	1080
acaaatttaa	ggagcgccta	acttatcatc	tatgacatac	cgcacaaaat	gataacatac	1140
tagagaaact	ttattgcaca	aaaggaaatt	tatccataag	gcaaaggaac	atcttaaggc	1200
tttgatata	catttaccaa	caagcattgt	ttgtattacc	cctaaagcgc	aagacatgic	1260
atccatgagt	catagtgtgt	atatctcaac	attgcaaagc	tacctttttt	ctattatact	1320
tttcgcatta	taggctagat	attatctata	catgtcaaca	aactctatcc	ctacgtcata	1380
tctgaagatt	cttttcttca	ctatataagt	tggcttcctt	gtcattgaac	tcacatcaac	1440
cagcccaa						1448

<210> 3

<211> 73

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia líder LLTCK

<400> 3

acacgtattt ttacaacaat accaacaaca acaacaacaa acaacattac aattacgtat	60
ttctctctct aga	73

<210> 4

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Codificación de secuencia de nucleótido SPGluB4

<400> 4

atggccacca ttgcgttctc ccggctgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac	60
ggctccatgg cc	72

<210> 5

<211> 1494

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia que nucleótido que codifica la forma madura de beta-glucosidasa acida humana

<400> 5

gcccgccct gcatccctaa aagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgt ctgcaatgcc	60
acatactgtg actccttga ccccccgacc ttctctgcc ttggtacct cagccgctat	120
gagagtacac gcagtggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatac	180
acgggcacag gcctgtact gaccctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga	240
tttgagggg ccatgacaga tgctgtgct ctcaacatcc ttgccctgtc accccctgcc	300
caaaatttgc tacttaaata gtacttctct gaagaaggaa tcggatataa catcatccgg	360
gtacccatgg ccagctgtga cttctccatc cgcacctaca cctatgcaga caccctgat	420
gatttcagt tgcacaact cagcctcca gaggaagata ccaagctcaa gataccctg	480
attcaccgag ccctgcagtt ggcccagcgt cccgttcac tcctgccag ccctggaca	540
tcaccactt ggctcaagac caatggagcg gtgaatggga aggggtcact caaggacag	600
cccggagaca tctaccacca gacctgggcc agatacttg tgaagttcct ggtgcctat	660
gctgagcaca agttacagtt ctgggcagtg acagctgaaa atgagccttc tgctgggctg	720
ttgagtggat acccctcca gtgcctgggc ttcaccctg aacatcagcg agacttcatt	780
gcccgtgacc taggtctac cctcgccaac agtactcacc acaatgtccg cctactcatg	840
ctggatgacc aacgcttgct gctgccccac tgggcaaagg tggactgac agaccagaa	900
gcagctaaat atgttcatgg cattgtctga cattggtacc tggactttct ggctccagcc	960
aaagccaccc taggggagac acaccgctg tccccaaaca ccatgctctt tgcctcagag	1020
gcctgtgtgg gctccaagtt ctgggagcag agtgtgcggc taggctcctg ggatcgaggg	1080
atgcagtaca gccacagcat catcacgaac ctctgtacc atgtggtcgg ctggaccgac	1140

tggaacctg ccctgaacc cgaaggagga cccaattggg tgcgtaactt tgcgacagt	1200
cccatcattg tagacatcac caaggacacg tttacaaac agcccatgtt ctaccacctt	1260
ggccacttca gcaagttcat tcctgagggc tcccagagag tggggctggt tgccagtcag	1320
aagaacgacc tggacgcagt ggcactgatg catcccgatg gctctgctgt tgtggtcgtg	1380
ctaaaccgct cctctaagga tgtgcctctt accatcaagg atcctgctgt gggcttcctg	1440
gagacaatct cacctggcta ctccattcac acctacctgt ggcatcgcca gtga	1494

<210> 6

<211> 253

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 6

gatcgttcaa acatttgga ataaagtffc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg	60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc	120
atgacgttat ttatgagatg gggttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	180
gcgatagaaa acaaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct	240
atgttactag atc	253

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador artificialmente sintetizada

<400> 7

gcatgcgaat tctacagggt tccttgctg 30

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador artificialmente sintetizada

<400> 8

tctagaagct atttgaggat gttattggaa 30

<210> 9

<211> 2850

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia GAA artificialmente sintetizada

<400> 9

atggccacca ttgcgttctc ccggctgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac 60

ggctccatgg ccggccacat cctgctgcat gacttctgc tgggcctcg ggagctgtcc	120
ggctccagcc cgggtctgga ggagaccac ccggcgcacc agcagggcgc gtcccggccg	180
ggccctcggg atgcgcaggc gcaccgggc cggcctcggg ccgtgcccac ccagtgcgat	240
gtgcctccca actcccgtt cgactgcgcg ccggacaaag ccatcaccca ggagcagtgc	300
gaggcgcgtg gctgctgcta catcccggcc aagcagggcc tgcagggcgc gcagatgggc	360
cagccctggt gcttctccc tccctctat ccctctaca agctggagaa cctgtctcc	420
tccgagatgg gctacaccgc caccctcacc cggaccacgc ccaccttct tccaaagac	480
atctcacc tgccgctgga tgtgatgat gagaccgaga accggctgca ttccaccatc	540
aaagaccgg ccaaccggcg gtatgagggt cctctggaga cgcctcgggt gcattcccg	600
gcgcccagcc ctctgtact cggtgagtc tccgaggagc cctcggcgt gattgtcgg	660
cggcagctgg atggccgggt gctgctcaac accaccgtt cgcctctgt ctccggac	720
cagttctgc agctgtccac ctccctgcc tccagtaca tcaccggcct ggccgagcac	780
ctgagccctc tcatgtgtc cactcttg acccgatca ccctgtgaa ccgggacctg	840
gcgcccacgc cgggcgcaa cctgtatggc tccatccct tctacctggc gctggaggat	900
ggcggatccg cgcattgggt gttctgtc aactccaatg ccatggatgt tgtgtgcag	960
cccagcccgg cgctgtctg gcggtccacc ggccgcatcc tggatgtga catctctg	1020
ggcccgagc cgaagtccgt tgtcagcag tacctggatg ttgtggcta tccctcatg	1080
cctccctact ggggcctggg ctccacctg tgccggtggg gctactctc caccgccatc	1140
accggcagg ttgtgagaa catgaccgg gcgcatttc ctctggatgt gcagtggaat	1200
gacctggact acatggact ccggcgggac ttacattca acaaagatgg ctccgggac	1260
ttcccgcca tggtcagga gctgcaccag ggccggccgc ggtacatgat gattgtgac	1320
ccggccatct cctctccgg ccggccggc tctaccggc cctatgatga gggcctgcgg	1380
cgtggcgtgt tcatcaccaa tgagaccggc cagcctctca ttggcaaagt gtggccgggc	1440
tccaccgct tccggactt caccaatccc accgcgctgg cgtggtggga ggacatggt	1500
gccgagttcc atgaccaggt gccctcgat ggcattgga ttgacatgaa tgagccctcc	1560
aactcatcc gtggctcca ggatggctgt cccaacaatg agctggagaa ccctccctat	1620
gtgccgggcg ttgtggcg caccctgcag gccgccacca tctgcgcgt cccccaccag	1680
ttctgtcca ccattacaa cctgcacaac ctgtatggcc tcaccgaggc cattgcgtcc	1740

caccgggcg c tggtgaaagc gcgtaggcacc cggcccttcg tgatctcccg gtccaccttc 1800
gccggccatg gccgggtatgc cggccattgg accggcgatg tgtggctctc ctgggagcag 1860
ctggcgctct cggtagccga gatcctgcag ttcaacctgc tgggcgtgcc tctggttggc 1920
gccgatgtgt gcggcttctt gggcaacacc tccgaggagc tgtgcgtgcg gtggaccacag 1980
ctgggcgctt tctatccctt catgcggaac cacaactccc tgctgtccct gcctcaggag 2040
ccctactcct tctccgagcc ggcgcagcag gccatgcgga aggcgctcac cctgcggtac 2100
gcgctgctgc ctcacctga caccctgtt caccaggcgc atgttgccgg cgagaccgtt 2160
gcgcggcctc tgttcttga gtttccaaa gactcctcca cctggaccgt tgaccaccag 2220
ctgctgtggg gcgaggcgct gctcatcacg ccggtgctgc aggcggcaa agccgaggtg 2280
accggctact tccctctggg cacctggtat gacctgcaga ccgtgcccat tgaggcgctg 2340
ggctccctgc ctctctctc ggccgcgcct cgggagccgg ccatccattc cgagggccag 2400
tgggtgacct tgccggcgcc tctggacacc atcaatgtgc acctgcgggc cggctacatc 2460
atccctctgc agggcccggg cctcaccacc accgagtccc ggcagcagcc catggcgctg 2520
gccgttgctc tcaccaaagg cggcgaggcg cgtggcgagc tgttctggga tgatggcgag 2580
tccctggagg tgctggagcg tggcgcgtag acccaggtga tcttctggc gcggaacaac 2640
accattgtga atgagctggt ccgggtgacc tccgaggcg ccggcctgca gctgcagaaa 2700
gtgaccgtgc tgggcgttgc caccgcgcct cagcaggtgc tgtccaatgg cgtgccggtg 2760
tccaacttca cctacagccc ggacaccaaa gtgctggaca tctgcgtgtc cctgctcatg 2820
ggcgagcagt tcctggtgtc ctggtgctag 2850

140

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/052832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 C12N9/24 C12N9/26 C12N9/40 A01H5/10 A61K38/43 A61K38/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/073839 A (PLANTECHNO S R L [IT]; FOGHER CORRADO [IT]; REGGI SERENA [IT]) 12 September 2003 (2003-09-12) cited in the application the whole document	1-53
X	WO 2005/021765 A (ORF LIFTAEKNI EHF [IS]; ORVAR BJORN LARUS [IS]) 10 March 2005 (2005-03-10) the whole document	1-53
X	WO 2005/017168 A (VENTRIA BIOSCIENCE [US]; HUANG NING [US]; RODRIGUEZ RAYMOND L [US]; HA) 24 February 2005 (2005-02-24) page 10, lines 3-28	1-53
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 July 2009		Date of mailing of the international search report 15/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bilang, Jürg

141

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/052832

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03073839	A	12-09-2003	AT 414418 T	15-12-2008
			AU 2003217458 A1	16-09-2003
			EP 1480510 A2	01-12-2004
			IT RM20020115 A1	01-09-2003
			SI 1480510 T1	30-04-2009
			US 2006031965 A1	09-02-2006
WO 2005021765	A	10-03-2005	AU 2004269200 A1	10-03-2005
			CA 2543605 A1	10-03-2005
			EP 1668137 A2	14-06-2006
			IS 8376 A	27-03-2006
			JP 2007503212 T	22-02-2007
WO 2005017168	A	24-02-2005	NONE	
WO 02064750	A	22-08-2002	AU 2002244071 A1	28-08-2002

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 015/082	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) TRANSACTIVA SRL	
(30) Prioridad	(31) Prioridad UD2008A000055	(32) Fecha 13/03/2008	(33) País IT
		(72) Inventor(es) STEFANO MARCHETTI Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 13/10/2010		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17/09/2009
	Fecha de presentación de la solicitud: 11/03/2009		N° publicación: WO 2009/112508
	No. de solicitud PCT/EP2009/052832		
(54) Titulo: UN MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UN PROTEÍNA HUMANA EN UNA PLANTA, EN PARTICULAR UNA ENZIMA LISOSOMAL RECOMBINANTE HUMANA EN UN ENDOSPERMO DE CEREAL			

Reivindicación(es):

1. Método para la producción de una proteína humana en planta, en particular de una enzima lisosomal humana recombinante en un endospermo de planta, caracterizado en que este comprende:

- un primer paso de transformación de planta por lo que la proteína es obtenida y confinada en un endospermo, el cual no es eventualmente absorbido por el embrión, y al presencia de grandes cantidades de proteína en el endospermo no afecta de manera negativa la viabilidad de la semilla y velocidad de la germinación;

- el uso, en el primer paso de la transformación de planta, de un promotor específico de endospermo impulsa la codificación de gen dicha proteína, y de péptido señal para una transferencia co-traslacional de una nueva proteína sintetizada en un lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo para su acumulación de tejido específico;

- un segundo paso de acumulación de proteína dentro del endospermo se semillas de una planta.
2. Método como en la solicitud 1, caracterizado por la acumulación de proteína dentro de vacuolas de almacenamiento de proteínas de endospermo (PSVs) o cuerpos de proteína (PBs).
3. Método con en la solicitud 1 o 2, caracterizado por la construcción de un vector de expresión de planta para la transformación de tales plantas, que contiene una secuencia de nucleótido que alberga los siguientes elementos:

i) un promotor de endospermo específico de origen natural o artificial;

ii) un UTR 5' de origen natural o artificial;

iii) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifique un péptido señal apropiado para orientar la proteína recombinante en el lumen del retículo endoplasmático de las células del endospermo y para determinar la acumulación de dicha proteína en un tejido específico;
- iv) una secuencia de nucleótido de origen natural o artificial que codifica la forma madura de la proteína humana;

v) un UTR 3' de origen natural o artificial; y donde el vector desarrollado en esta forma para transformación de planta es usado.
4. Método como en la solicitud 3 o 4, caracterizado en que la secuencia de nucleótido del vector de expresión es como se indica en SEQ ID No: 1.
5. Método como en la solicitud 3 o 4, caracterizado en que el vector de expresión es introducido en cepas bacteriales, las cuales son, directa o indirectamente, usados para transformación de planta.
6. Método como en la solicitud 5, caracterizado en que la cepa bacterial elegida pertenece a un grupo que comprende *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.
7. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que las plantas transformadas son cereales.
8. Método como en las solicitudes 5 y 7 o 6 y 7, caracterizado en que la cepa bacterial es usada para la transformación del callo embriogénico de arroz (*Oryza sativa ssp. Japonica*, CR W3 innato).
9. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa acido humano.
10. Método como en cualquiera de las solicitudes desde 1 a 8, caracterizado en que la enzima lisosomal es el beta-glucosidasa acido humano.
11. Método como en cualquiera de las solicitudes anteriores, caracterizado en que este comprende un tercer paso de fabricación industrial de semilla de planta.

143

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 69,463
FECHA : AGOSTO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156798795	23/02/2010	83,297,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO CAMBIO TITULARIDAD-
		TOTAL :	\$ 350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010: 17896 - 841-001-3

144

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 79,591
FECHA : SEPTIEMBRE 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	156798821	23/09/2010	5,315,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES	13,000.00
TOTAL :			\$ 13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: A896-841-001-3

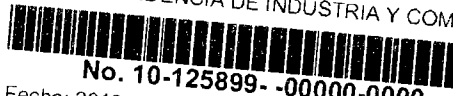
145

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 80,678
 FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899-00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 148

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664700	27/06/2010	57,040,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
	TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

C/O: 17896 - 841-001-3

146

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 80,679
FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132664700	27/06/2010	57,040,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
	TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17896-841-001-3

142

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,170
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666995	04/10/2010	49,088,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** S.DISTINTIVO CAMBIO TITULARIDAD-	350,000.00
		TOTAL :	\$ 350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17896 - 841-001-3

148

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 83,210
FECHA : OCTUBRE 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-125899-00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	132666995	04/10/2010	49,099,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL AROS 17 a 20 PARA MANT	907,000.00

TOTAL : \$ 907,000.00

SON: NOVECIENTOS SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO. 17896-841-001-3



No. 10-125899- -00000-0000

Fecha: 2010-10-11 12:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ 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	430
	Oficio No.	

NO 14095

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

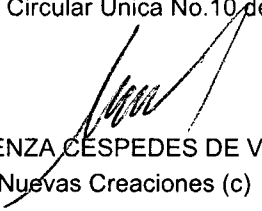
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 125899



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

29 OCT. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11